

Molekulare Regulation und Biochemie
des anaeroben Langzeitüberlebens
von *Pseudomonas aeruginosa*

Von der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von Martin Eschbach
aus Wehr / Baden

1. Referent: Prof. Dr. D. Jahn

2. Referent: Prof. Dr. K. N. Timmis

eingereicht am: 23.02.2004

mündliche Prüfung (Disputation) am: 21.06.2004

Druckjahr: 2004

Vorveröffentlichungen der Dissertation:

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch Prof. Dr. D. Jahn, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

Eschbach, M., Möbitz, H., Rompf, A. & Jahn, D. (2003) Members of the genus *Arthrobacter* grow anaerobically using nitrate ammonification and fermentative processes: anaerobic adaptation of aerobic bacteria abundant in soil. FEMS Microbiol Lett 223:227-230.

Eschbach, M., Schreiber, K., Trunk, K., Buer, J., Jahn, D. & Schobert, M. (2004) Long-Term Anaerobic Survival of the Opportunistic Pathogen *Pseudomonas aeruginosa* via Pyruvate Fermentation. J Bacteriol (im Druck).

Trunk, K., Quäck, N., Eschbach, M., Jansch, L., Trost, M., Wehland, J., Münch, R., Buer, J., Jahn, D. & Schobert, M. (2004) Identification of Anr regulated genes in *Pseudomonas aeruginosa* by a combined approach using GeneChip[®], proteomics and bioinformatics. Mol Microbiol (eingereicht zur Publikation).

Ergebnisse! Sie fragen mich, warum ich
so viele Ergebnisse habe. Ich weiß
tausend Dinge, die nicht funktionieren.

Thomas Alva Edinson

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Der anaerobe Energiestoffwechsel von Bakterien am Beispiel des Gram-negativen Modellorganismus <i>Escherichia coli</i>	1
1.1.1	Die Respiration in <i>Escherichia coli</i>	1
1.1.2	Die Gemischte Säuregärung in <i>Escherichia coli</i>	2
1.2	Die Denitrifikation	5
1.3	Das opportunistische Pathogen <i>Pseudomonas aeruginosa</i> als Modellorganismus	7
1.3.1	Der aerobe Energiestoffwechsel von <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7
1.3.2	Der bisher untersuchte anaerobe Energie-Metabolismus von <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8
1.3.2.1	Die Nitrat-Atmung	8
1.3.2.2	Die Arginin-Fermentation	9
1.3.3	Pathogenität von <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10
1.3.4	Neue Erkenntnisse aus dem <i>Pseudomonas</i> -Genomprojekt	12
1.4	Regulatoren der Denitrifikations- und Hämbiosynthesegene in <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	13
1.4.1	Die Fnr homologen Regulatoren Anr und Dnr	13
1.4.2	Das Nitratsensorsystem NarXL	14
1.4.3	Der DNA-biegende <i>integration host factor</i> (IHF)	15
1.4.4	Die Katabolit-Regulation	15
1.5	Proteomanalyse	17
1.6	Zielsetzung der Arbeit	19
2	MATERIAL UND METHODEN	20
2.1	Abkürzungen	20
2.2	Geräte und Chemikalien	22
2.2.1	Geräte	22
2.2.2	Chemikalien und Materialien	23
2.3	Bakterienstämme und Plasmide	24
2.4	Medien und Medienzusätze	26
2.4.1	Komplexmedium	26

Inhaltsverzeichnis

2.4.2	Minimalmedium M9.....	26
2.4.3	OS-Minimalmedium für <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	26
2.4.4	Zusätze und Antibiotika	27
2.5	Mikrobiologische Techniken	28
2.5.1	Sterilisation.....	28
2.5.2	Bestimmung der Zellzahl	28
2.5.2.1	Optische Dichte im Photometer	28
2.5.2.2	Bestimmung der Lebendzellzahl mittels gewachsener Kolonien (CFU) auf LB-Agar	28
2.5.2.3	Lebendfärbung von Bakterien.....	28
2.5.3	Wachstumsbedingungen.....	29
2.5.3.1	Bakterienkulturen unter aeroben und anaeroben Bedingungen	29
2.5.3.2	Anaerobe Fermentationsansätze mit <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	29
2.5.4	Glycerinkulturen.....	30
2.6	Molekularbiologische Methoden.....	31
2.6.1	Präparation genomischer DNA.....	31
2.6.2	Amplifikation von DNA-Fragmenten	31
2.6.3	Bestimmung von DNA- und RNA-Konzentration	32
2.6.4	Das Schneiden von DNA mittels Restriktionsendonukleasen	32
2.6.5	Trennung und Isolierung von DNA-Fragmenten	32
2.6.6	Ligation von DNA.....	33
2.6.7	Transformation von Bakterien.....	33
2.6.7.1	Transformation von <i>Escherichia coli</i>	33
2.6.7.2	Transformation von <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	34
2.6.8	Präparation von Plasmid-DNA.....	35
2.6.8.1	Mini-Präparation von DNA	35
2.6.8.2	Midi-Präparation von DNA	36
2.6.9	Microarray-Experimente	36
2.7	Klonierungsstrategien.....	37
2.7.1	Konstruktion einer <i>lacZ</i> -Reportergenfusion des <i>ackA</i> -Promotors.....	37
2.7.2	Konstruktion von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Knockout-Mutanten.....	37
2.7.2.1	Konstruktion der chromosomalen <i>pta</i> -Mutante PAO-ME1	37
2.7.2.2	Konstruktion der chromosomalen <i>ldhA</i> -Mutante PAO-ME3.....	39
2.7.2.3	Konstruktion der chromosomalen <i>hemA</i> -Mutante PAO-ME2	40
2.8	Proteomics-Analyse: Zwei-dimensionale Elektrophorese mit immobilisierten pH-Gradienten	42
2.8.1	Zellernte	42
2.8.2	Phenolextraktion und Acetonfällung der Proteine.....	42
2.8.3	Bestimmung der Proteinkonzentration	43
2.8.3.1	Der BCA-Test.....	43

Inhaltsverzeichnis

2.8.3.2	Klassische SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese	43
2.8.4	Isoelektrische Fokussierung im immobilisierten pH-Gradienten	45
2.8.4.1	Rehydratisierung der Proteine.....	46
2.8.4.2	Elektrophorese der 1. Dimension.....	46
2.8.4.3	Äquilibration der IPG-Streifen	47
2.8.5	SDS-PAGE (<i>Sodium dodecylsulfate</i> - <i>Polyacrylamide gelelectrophoresis</i>).....	47
2.8.5.1	Herstellung der SDS-Polyacrylamid-Gele	48
2.8.5.2	Elektrophorese der 2. Dimension.....	48
2.8.6	Synthese des Fluoreszenzfarbstoffes RuBPS	49
2.8.7	Fixierung und Färbung der 2-D Gele	50
2.8.7.1	Fluoreszenzfärbung mit RuBPS.....	50
2.8.7.2	Färbung mit kolloidalem Coomassie Brilliant Blau.....	51
2.8.8	Dokumentation und Auswertung der Gele	51
2.8.9	MALDI-TOF MS	51
2.8.9.1	Probenaufbereitung für MS und Proteasebehandlung.....	52
2.8.9.2	Reinigung der durch Proteaseverdau gewonnenen Peptide	53
2.9	Enzymanalytik.....	54
2.9.1	Der β -Galaktosidase-Enzymtest	54
2.9.2	Der Phosphotransacetylase-Enzymtest.....	55
2.9.2.1	Herstellung eines zellfreien Proteinextraktes.....	56
2.9.2.2	Der Pta-Enzymtest	56
2.10	Analyse der Umsetzung von Substraten zu Fermentationsprodukten mittels HPLC-Analyse der Wachstumsmedien	58
2.11	Methoden für die <i>in silico</i>-Analyse des Genoms von <i>Pseudomonas aeruginosa</i>.....	59
2.11.1	Datenbanksuche mit den <i>BLAST</i> -Programmen	59
2.11.2	Matrixsuche mit der PRODORIC-Datenbank	60
2.11.3	Bezug von Sequenzen und anderen Informationen	60
3	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	61
3.1	Der bisher bekannte fermentative Energiemetabolismus von <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	61
3.2	<i>in silico</i>-Identifizierung alternativer Fermentationswege in <i>Pseudomonas aeruginosa</i>.....	62
3.3	Das anaerobe Überleben von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ohne externe Elektronenakzeptoren	66
3.3.1	Kein anaerobes Wachstum von <i>P. aeruginosa</i> in Anwesenheit von Glucose, Gluconat oder Pyruvat	66
3.3.2	Pyruvat unterstützt das Überleben von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> unter anaeroben Bedingungen	66
3.3.2.1	Bestimmung der Lebendzellzahl unter anaeroben Bedingungen	66
3.3.2.2	Alternative Bestimmung der Lebendzellzahl durch differentielle Fluoreszenzfärbung von lebenden und toten Zellen.....	69

3.3.2.3	Resümee zu den unterschiedlichen Methoden der Zellzahlbestimmung	69
3.3.3	Fermentation von Pyruvat durch <i>Pseudomonas aeruginosa</i> im anaeroben Milieu	70
3.3.3.1	HPLC-Analysen der Fermentationsprodukte in Kulturüberständen	70
3.3.3.2	Vergleich der Fermentationsbilanzen mit den Lebendzellzahlen	74
3.3.3.3	Weitere Kohlenstoff-Quellen.....	76
3.3.3.4	Kinetik der Pyruvat-Umsetzung	76
3.3.4	Die Beteiligung der Genloci <i>gacS-ldhA</i> und <i>ackA-pta</i> an der Pyruvat-Fermentation in <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	77
3.3.4.1	Herstellung von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> – Mutanten in potentiellen Genen der Pyruvat- Fermentation	77
3.3.4.1.1	Konstruktion der <i>pta</i> - Mutanten PAO-ME1	77
3.3.4.1.2	Konstruktion der <i>ldhA</i> - Mutanten PAO-ME3	79
3.3.4.2	Wachstumsverhalten der <i>pta</i> - und <i>ldhA</i> - Mutanten unter fermentativen Bedingungen	81
3.3.4.3	Genexpression der fermentativen <i>Pseudomonas aeruginosa</i> -Loci <i>gacS-ldhA</i> und <i>pta-ackA</i>	84
3.3.4.3.1	Der <i>ldhA</i> -Locus wird unabhängig vom Sauerstoffpartialdruck exprimiert	84
3.3.4.3.2	Sauerstoffpartialdruck gesteuerte Expression des <i>ackA-pta</i> Genlocus.....	85
3.3.4.3.2.1	Bestimmung der Expression mittels DNA-Microarrays	85
3.3.4.3.2.2	Bestimmung der Expression mittels Reportergenfusion.....	86
3.3.4.3.2.3	Bestimmung der Phosphotransacetylase-Aktivität	88
3.3.4.3.3	Computergestützte Untersuchung des Promotorbereiches von <i>ackA-pta</i>	89
3.3.5	Einfluss von bekannten Regulatoren in <i>Pseudomonas aeruginosa</i> auf die Fermentation von Pyruvat....	92
3.3.5.1	Die Redoxregulatoren Anr und Dnr.....	92
3.3.5.2	Der <i>integration host factor</i> IHF	93
3.3.5.3	Der Nitratregulator NarL	93
3.3.6	Zusammenfassung der Pyruvat-Fermentation in <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Wildtyp und den untersuchten Mutanten	96
3.3.6.1	Bilanz der Pyruvat-Fermentation.....	96
3.3.6.2	Regulation der Pyruvat-Fermentation.....	97
3.3.7	Fermentation von Pyruvat in <i>Pseudomonas aeruginosa</i> bei zunehmender Konzentration der Fermentationsprodukte	98
3.3.8	Der Effekt von externem Acetat auf die Geschwindigkeit der Pyruvat-Fermentation	100
3.3.9	Der Effekt des pH-Wertes auf die Geschwindigkeit der Pyruvat-Fermentation.....	102
3.3.10	Die Fermentation von Pyruvat in <i>Pseudomonas aeruginosa</i> unter denitrifizierenden sowie Arginin- fermentierenden Bedingungen.....	106
3.3.11	Einfluss der Häm-Biosynthese auf die Pyruvat-Fermentation in <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	109
3.3.11.1	Konstruktion einer <i>hemA</i> -Mutante.....	109
3.3.11.2	Anaerobe Inkubation der <i>hemA</i> -Mutante mit Pyruvat	111
3.3.12	Experimentell verifiziertes Modell einer anaeroben Pyruvat-Fermentation in <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	112
3.4	Identifizierung Anr-regulierter Gene in <i>Pseudomonas aeruginosa</i> mit Hilfe der Proteomanalyse....	114

3.4.1	Proteinmuster von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Wildtyp und der <i>anr</i> -Mutante unter aeroben und anaeroben Bedingungen	114
3.4.1.1	Anzucht und Ernte der Zellen	114
3.4.1.2	Zellaufschluss, Proteinfällung und Proteinbestimmung.....	115
3.4.1.3	2-D Gele.....	116
3.4.1.4	Auswertung und Vergleich der 2-D Gele	120
3.4.1.5	Zuordnung der identifizierten Proteine in Klassen mit gleichem Regulationsmuster	127
3.4.1.6	Untersuchung der Promotorbereiche der identifizierten Gene auf mögliche Bindestellen des Anr-Regulators	129
3.4.1.6.1	Im <i>P. aeruginosa</i> Wildtyp unter anaeroben Bedingungen induzierte Gene	130
3.4.1.6.2	Unter anaeroben Bedingungen von Anr unabhängig induzierte Gene	134
3.4.1.6.3	In der <i>P. aeruginosa anr</i> -Mutante unter anaeroben Bedingungen induzierte Gene	137
3.4.2	Zusammenfassung der Resultate aus den 2-D Gelexperimenten.....	138
4	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	139
4.1	Zusammenfassung.....	139
4.2	Ausblick	140
5	LITERATUR UND INTERNET-ADRESSEN.....	141
5.1	Literaturverzeichnis.....	141
5.2	Internet-Adressen.....	151

1 Einleitung

1.1 Der anaerobe Energiestoffwechsel von Bakterien am Beispiel des Gram-negativen Modellorganismus *Escherichia coli*

Beim Gram-negativen Modellbakterium *Escherichia coli* ist die Enzymatik und Regulation des Energiestoffwechsels gut verstanden und charakterisiert (Gennis & Stewart, 1996). Dies bietet einen ersten Ansatzpunkt für entsprechende Untersuchungen bei *Pseudomonas aeruginosa*, bei dem der anaerobe Energiemetabolismus weniger gut verstanden ist. Allerdings geben bereits identifizierte Unterschiede des anaeroben Stoffwechsels beider Bakterien Limitationen dieses Ansatzes vor.

Bei *E. coli* können zwei Formen der Energiegewinnung unterschieden werden: Respiration (aerob und anaerob) und Fermentation (anaerob). Die Übergänge sind dabei fließend und durch die Verfügbarkeit von Sauerstoff oder anderen Endelektronenakzeptoren bestimmt. Die Effizienz der Energiegewinnung nimmt dabei parallel mit dem Redoxpotential des Elektronenakzeptors von aerober Atmung über diverse Arten der anaeroben Atmung bis zum fermentativen Modus hin stark ab. Daher ist *E. coli* evolutionär optimiert, zuerst immer nur das Substrat mit dem elektropositivsten Potential zu nutzen.

1.1.1 Die Respiration in *Escherichia coli*

Der Grund für die starke Abnahme der Effizienz hängt mit dem Mechanismus der Energiegewinnung zusammen. Unter allen drei oben genannten Bedingungen findet eine Substratkettenphosphorylierung zur Synthese von ATP statt. Während aber bei der Fermentation (siehe unter 1.1.2) die Substratkettenphosphorylierung der einzige Weg zur Synthese von ATP darstellt, wird bei der Respiration noch das Transmembranpotential von der ATPase zur ATP-Synthese ausgenutzt. Dieses Potential wird aufgebaut, indem die Reaktionsenthalpie der Redoxvorgänge dazu verwendet wird, Protonen aus dem Cytoplasma in das Periplasma zu pumpen. Dabei entsteht sowohl durch die Ladungstrennung als auch durch das Konzentrationsgefälle der Protonen ein elektrochemisches Potential, welches später nicht nur zur ATP-Synthese, sondern auch für den aktiven Transport über die Membran oder für die Flagellen-Rotation genutzt werden kann.

Im Mittelpunkt der Redoxkette befinden sich Chinone, die von den cytosolischen Substraten über die primären Dehydrogenasen mit Elektronen versorgt werden und diese danach an die terminalen Oxidasen weitergeben. Bei diesem Fluss fallen die übertragenen Elektronen in

ihrem Potential, wobei bei der aeroben Elektronenübertragung von NADH auf Sauerstoff am meisten ATP gebildet wird. Dies liegt am großen Potentialunterschied zwischen dem Elektronendonator NADH mit einem Standardpotential E_0 von -320 mV und dem Elektronenakzeptor Sauerstoff mit einem E_0 von $+820\text{ mV}$.

Das Respirationssystem von *E. coli* ist aus einzelnen Modulen aufgebaut (siehe Abb. 1), die dem Organismus eine Feinabstimmung je nach physiologischen Bedingungen ermöglichen. Ein komplexes Regulationsnetzwerk passt dabei die Zusammenstellung und damit die Eigenschaften des Respirationssystems den jeweiligen Bedürfnissen an (Gennis & Stewart, 1996).

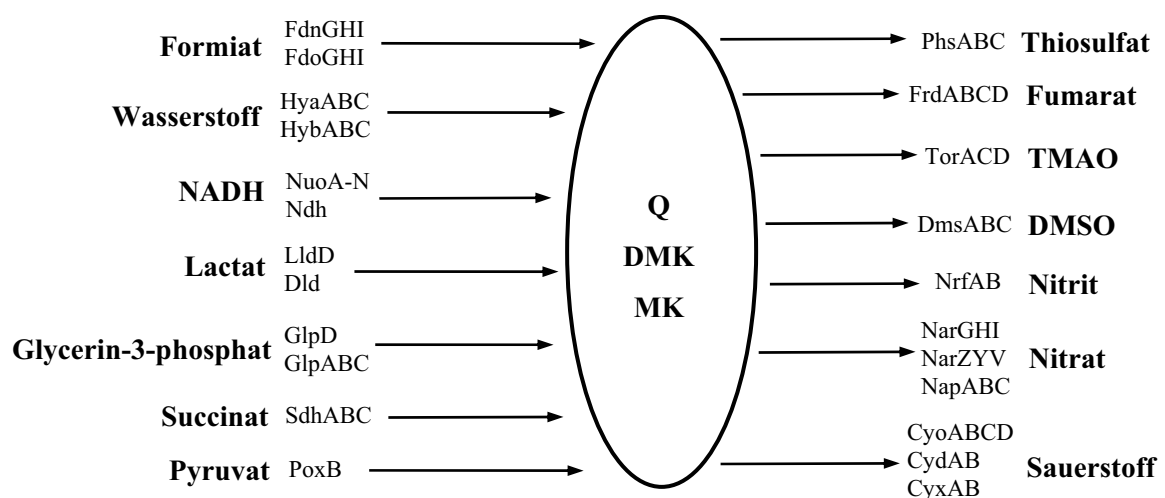


Abb. 1 Die primären Dehydrogenasen und terminalen Oxidasen von *E. coli* (Abbildung modifiziert nach Gennis & Stewart, 1996).

Die Elektronen werden durch die primären Dehydrogenasen von den Elektronendonoren auf die Chinone (Q = Ubichinon, MK = Menachinon, DMK = Dimethylmenachinon) übertragen und fließen von dort aus weiter über die terminalen Oxidasen auf die Elektronenakzeptoren. Dabei werden Protonen über die Membran transloziert. Die Substrate sind nach steigendem Redoxpotential geordnet und die Pfeile geben die Richtung der Elektronenübertragung an. Die Enzymnamen ergeben sich durch Anhängen von Dehydrogenase bzw. Reduktase an den Namen des entsprechenden Substrates. Ausnahmen sind: Pox, Pyruvat-Oxidase; Hya und Hyb, Hydrogenasen; Cyo, Cyd und Cyx, Cytochrom-Oxidasen.

1.1.2 Die Gemischte Säuregärung in *Escherichia coli*

Bei einer Abnahme der Sauerstoffkonzentration läuft zunächst noch der gesamte Elektronenfluss über die Cytochrome, die Elektronen auf Sauerstoff übertragen. Unterhalb eines bestimmten Sauerstoffpartialdruckes im Habitat werden dann Enzyme des sauerstoffunabhängigen Energiestoffwechsels induziert. Von zentraler Bedeutung ist dabei die Wirkung des Enzyms Pyruvat-Formiat-Lyase (PFL). Dieses spaltet den zentralen

Energiemetaboliten Pyruvat, welcher aufgrund der Verknappung von Sauerstoff über den Citratcyclus nicht mehr effizient unter Bildung von NADH umgesetzt werden kann, in Acetyl-CoA und Formiat. Bei Anwesenheit alternativer Elektronenakzeptoren, z.B. Nitrat, setzt nun die anaerobe Atmung ein, wobei das gebildete Formiat als Elektronendonator genutzt wird. Das Acetyl-CoA dient bei Erschöpfung der alternativen Elektronenakzeptoren im fermentativen Modus zur Substratphosphorylierung unter Beteiligung der Enzyme Phosphotransacetylase (Pta) und Acetat-Kinase (AckA). Zudem können bei dem Wegfallen der alternativen Elektronenakzeptoren Reduktionsäquivalente über die Formiat-Hydrogen-Lyase (FHL), welche Formiat in Wasserstoff und Kohlendioxid spaltet, oxidiert werden. Durch die enzymatischen Reaktionen der Lactat-Dehydrogenase (LdhA), die Pyruvat zu Lactat reduziert, und der Alkohol-Dehydrogenase (AdhE), welche Acetyl-CoA über Acetaldehyd in Ethanol umwandelt, können große Mengen NADH zu NAD^+ reoxidiert werden. Dabei kann zwar die in den Fermentationsprodukten noch enthaltene Energie nicht genutzt werden, aber die Regeneration von NADH erlaubt der Glykolyse die weitere lebenserhaltende Produktion von ATP.

Das Fermentationsmodell von *E. coli* zeigt deutlich, dass die Fermentation allgemein ein Kompromiss ist zwischen dem Versuch, den maximalen Energiegewinn zu erzielen, und dem gleichzeitigen Bestreben, die Redoxbalance in der Zelle aufrecht zu erhalten (Böck & Sawers, 1996). Abb. 2 gibt einen schematischen Überblick über die fermentativen Stoffwechselwege in *E. coli*.

E. coli besitzt also einen gut verstandenen anaeroben Energiemetabolismus. Fast alle daran beteiligten Gene sind identifiziert, sequenziert und die entsprechenden Enzyme biochemisch untersucht worden. Damit bietet sich die Möglichkeit, diese Erkenntnisse auf andere Organismen zu übertragen. Die anaerobe Fermentation von *E. coli* dient im folgenden als Orientierung für die entsprechenden Untersuchungen an *P. aeruginosa*. Auf die Limitationen dieses Ansatzes wurde bereits hingewiesen.

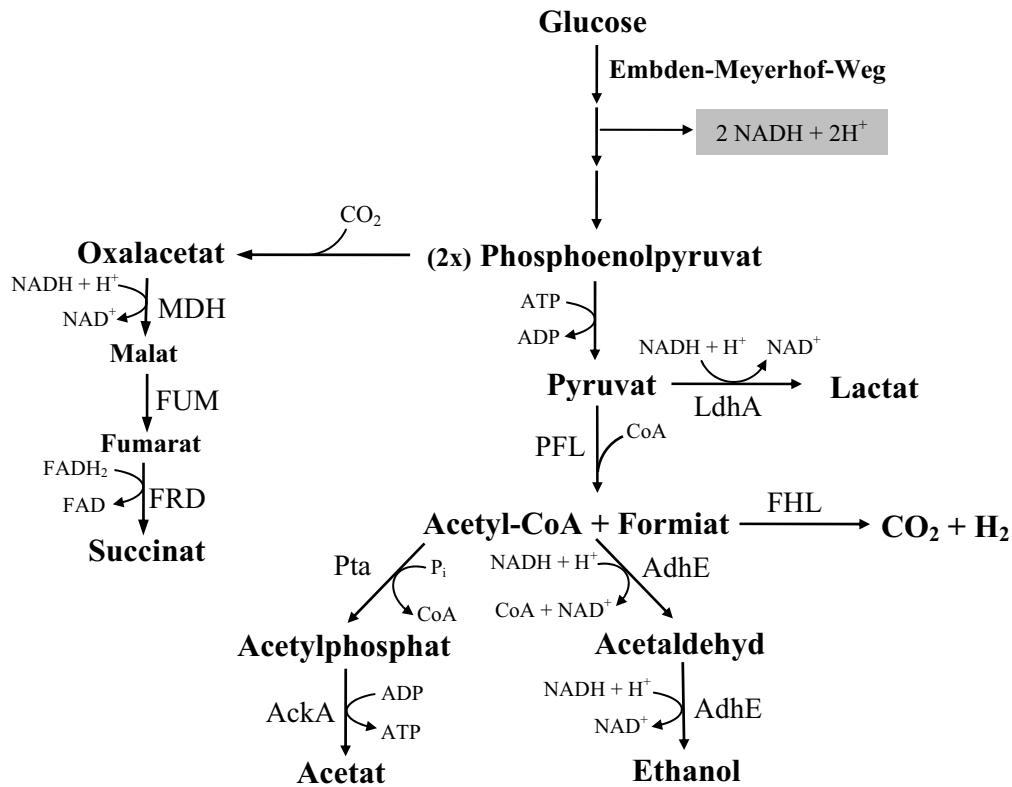


Abb. 2 Fermentative Stoffwechselwege in *E. coli* (Abbildung modifiziert nach Böck & Sawers, 1996).

Die Reaktionen des Embden-Meyerhof-Weges von Glucose zu Phosphoenolpyruvat sind in Abb. 4 dargestellt.

Enzymnamen: LdhA, NAD⁺-abhängige D-Lactat-Dehydrogenase; PFL, Pyruvat-Formiat-Lyase; FHL, Formiat-Hydrogen-Lyase; Pta, Phosphotransacetylase; AckA, Acetat-Kinase; AdhE, Alkohol-Dehydrogenase. Enzyme des reduktiven Citratcyclus-Halbkreises: MDH, Malat-Dehydrogenase; FUM, Fumarase; FRD, Fumarat-Reduktase.

1.2 Die Denitrifikation

Stickstoff-Oxide werden in vielen Bakterien nur fakultativ genutzt, da die Nutzung von Sauerstoff als terminaler Elektronenakzeptor energetisch effizienter ist. Die N-Oxide werden bei der Denitrifikation anstelle von Sauerstoff in mehreren Schritten unter Bildung einer N-N-Bindung zu molekularem Stickstoff reduziert (Abb. 3).

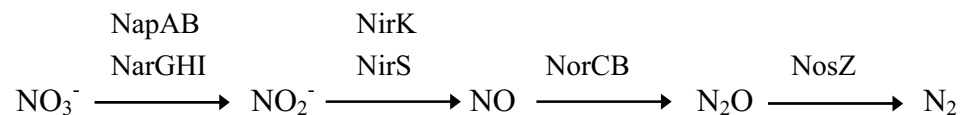


Abb. 3 Die Reaktionen der Nitrat – Atmung.

NapAB, periplasmatische Nitratreduktase; NarGHI, cytoplasmatische Nitratreduktase; NirK, respiratorische Nitritreduktase (kupferhaltig); NirS, respiratorische Nitritreduktase (ein Hämenzym); NorCB, NO-Reduktase; NosZ, N₂O-Reduktase

Die bei diesen Prozessen ins Periplasma übertragenen Protonen dienen durch den Aufbau eines elektrochemischen Protonengradienten (PMF, *proton motive force*) und Bildung einer Potentialdifferenz der Energiekonservierung. Die Bildung der benötigten Enzyme wird in der Regel durch einen niedrigen Sauerstoffpartialdruck und durch die Verfügbarkeit von N-Oxiden induziert.

Nitrit ist das erste Produkt, das bei Prokaryoten im Rahmen der Denitrifikation durch die Reaktion von dissimilatorischen Nitratreduktasen (Moreno-Vivian *et al.*, 1999) mit Nitrat entstehen kann. Bisher sind zwei Enzymtypen bekannt, eine periplasmatische (NapAB) und eine membranständige cytoplasmatisch orientierte Nitratreduktase (NarGHI).

Die im Periplasma lokalisierte dissimilatorische Nitratreduktase NapAB leistet im Gegensatz zur Nitratreduktase NarGHI keinen Beitrag zur Protonentranslokation. Eine Hauptaufgabe scheint darin zu bestehen, als nicht protonenpumpende terminale Oxidase das Redoxgleichgewicht zu wahren (Berks *et al.*, 1995; Moreno-Vivian & Ferguson, 1998; Richardson *et al.*, 1988). Da sie auch unter aeroben Bedingungen Nitrat reduzieren kann, werden überschüssige Reduktionsäquivalente abgebaut. Der Elektronentransport bleibt aber auch in Abwesenheit von Sauerstoff erhalten. Dies erleichtert deutlich den Übergang zum anaeroben Stoffwechsel (Siddiqui *et al.*, 1993). Es wird zusätzlich ein Selbstverteidigungsmechanismus durch Produktion hoher Nitritmengen gegen bakterielle Konkurrenz diskutiert (Kerber & Cardenas, 1982). Das *Rhodobacter*-Enzym besteht aus einem Heterodimer (NapAB) und besitzt Molybdän, einen Molybdopterin-Guanin-Dinukleotid (MGD) Kofaktor

und ein Fe-S-Zentrum (NapA). Es enthält aber auch zwei Häm *c* -Moleküle (NapB), über die von einem membranverankerten Protein (NapC) Elektronen aus dem Chinonspeicher bezogen werden. Die *nap*-Expression wird meist durch Nitrat verstärkt und ist je nach Bakterium mit oder ohne Sauerstoff stärker induziert.

Die zweite dissimilatorische Nitratreduktase ist in der Regel ein Heterotrimer (NarGHI) und auf der cytoplasmatischen Seite membranverankert (Bertero *et al.*, 2003). Dies geschieht über die NarI-Untereinheit, die die benötigten Elektronen über zwei Häm *b* -Gruppen aus dem Chinonspeicher an NarH weiterleitet und dabei zwei Protonen ins Periplasma pumpt (Berks *et al.*, 1995; Richardson & Watmough, 1999). Über vier Fe-S-Zentren werden die Elektronen auf die aktive Untereinheit NarG übertragen, wo am Molybdän der beiden Molybdopterin-Guanin-Dinukleotid Kofaktoren die eigentliche Reduktion von Nitrat stattfindet. Das Nitrat wird vermutlich über einen vom Protonengradient abhängigen NO_3^-/H^+ -Symport oder einen $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ -Antiport in die Zelle transportiert (NarK). Die Expression der Gene der respiratorischen Nitratreduktase erfolgt meist unter Sauerstoff-limitierenden Bedingungen und erfordert in einigen Fällen die weitere Induktion durch Nitrat oder Nitrit.

Im zweiten Schritt der Denitrifikation wird Nitrit zu NO reduziert. Es gibt zwei Typen von respiratorischen Nitritreduktasen, eine kupferhaltige NirK und eine Häm enthaltende NirS. Beide Enzymvarianten sind im Periplasma lokalisiert. Es lässt sich anhand der Phylogenie bislang nicht vorhersagen, ob ein Bakterium NirS oder NirK enthält, es wurden aber bisher nie beide Enzyme in einem Organismus gefunden. Das freigesetzte NO, das für die Zelle hoch toxisch ist, wird sofort weiter zu N_2O umgesetzt. Es bindet deshalb hoch affin an die membranständige NO-Reduktase NorCB (Braun & Zumft, 1991). Die abschließende Reduktion von N_2O zu N_2 erfolgt an der periplasmatisch lokalisierten N_2O -Reduktase NosZ.

1.3 Das opportunistische Pathogen *Pseudomonas aeruginosa* als Modellorganismus

Pseudomonas aeruginosa gehört in die γ -Gruppe der Proteobakterien und ist ein Gram-negatives, polar begeißeltes Stäbchen mit einem hohen GC-Gehalt von 68 %. Wie andere Gram-negative Stäbchen besitzt *P. aeruginosa* in der äußeren Membran Lipopolysaccharide. Das Bakterium trägt Fimbrien, die zur Anheftung benötigt werden, beispielsweise an die Epithelzellen der Lungenschleimhaut. Eine eigene Kapsel wird nicht gebildet, wohl aber eine Schleimschicht aus Polysacchariden und Proteinen. Die meisten *P. aeruginosa*-Stämme bilden unter geeigneten Wachstumsbedingungen einen gelben, grünlich fluoreszierenden Farbstoff, das Fluorescein. Außerdem wird ein weiterer blaugrüner Farbstoff gebildet, das Pyocyanin, dem der Organismus seinen alten Namen *Pyocyaneus* verdankt. Dieses Pigment findet man typischerweise bei Wundinfektionen. Charakteristisch ist auch die Bildung des Duftstoffs o-Aminoacetophenon. Die Kulturen weisen daher einen süßlich-aromatischen Geruch auf.

1.3.1 Der aerobe Energiestoffwechsel von *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa besitzt einen effizienten aeroben Stoffwechsel, welcher es zu einem der am schnellsten wachsenden Bakterien macht. Die Generationszeit beträgt bei 37 °C nur etwa 20 Minuten. Auch vermehrt sich *P. aeruginosa* im Gegensatz zu anderen Pseudomonaden selbst noch bei 42 °C. Das Pathogen ist in der Lage, eine Vielzahl an Kohlenstoffquellen zu nutzen. Dazu gehören verschiedene Mono-, Di- und Tricarbonsäuren sowie Zucker, Fettsäuren, Alkohole, Polyalkohole, Glycole, aromatische Verbindungen, Amine und Aminosäuren.

Für den Abbau von Glucose verwenden Pseudomonaden den Entner-Doudoroff-Weg, der wegen des charakteristischen Zwischenproduktes 2-Keto-3-desoxy-6-phosphogluconat auch KDPG-Weg genannt wird (Abb. 4; Lessie & Phibbs, 1984). Enterobakterien nutzen dagegen hauptsächlich den Embden-Meyerhof-Weg, bei dem mehr Energie in Form von ATP gewonnen werden kann (Abb. 4). Allerdings bevorzugt *P. aeruginosa*, wie oben bereits erwähnt, organische Säuren (vor allem Zwischenprodukte des Citratzyklus) anstelle von Glucose als Kohlenstoff- und Energiequelle.

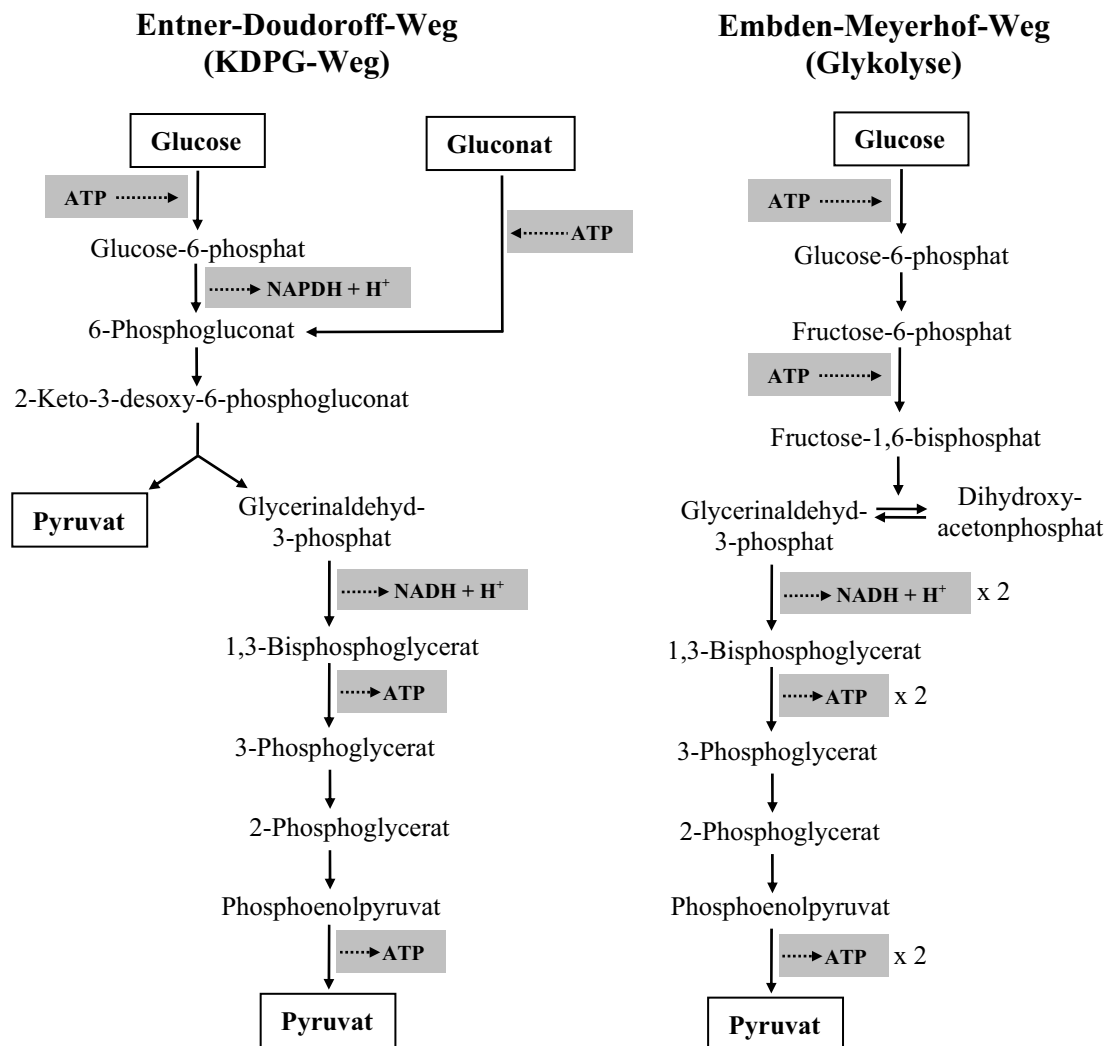


Abb. 4: Zwei unterschiedliche Wege des Hexose-Abbaus.

Mit dem Embden-Meyerhof-Weg (rechts) werden aus 1 mol Glucose 2 mol NADH + H⁺ und 2 mol ATP erzeugt. Mit dem Entner-Doudoroff-Weg (links) werden aus 1 mol Glucose 1 mol NADPH + H⁺, 1 mol NADH + H⁺ und nur 1 mol ATP gewonnen.

1.3.2 Der bisher untersuchte anaerobe Energie-Metabolismus von *Pseudomonas aeruginosa*

1.3.2.1 Die Nitrat-Atmung

P. aeruginosa ist ein fakultativ anaerober Organismus. In Abwesenheit von Sauerstoff führt das Pathogen eine Denitrifikation durch, wie in Kap. 1.2 allgemein für Bakterien beschrieben. Die komplette Regulation des *P. aeruginosa narGHIJ*-Operons, dessen Gene für die Untereinheiten des Enzyms des 1. Schrittes der Nitrat-Atmung kodieren (siehe Abb. 3), ist in unserem Arbeitskreis untersucht worden (Krieger, 2001). An der Regulation sind neben dem

Zwei-Komponenten-System NarXL (siehe Kap. 1.4.2) auch die beiden Redoxregulatoren Anr/Dnr (siehe Kap. 1.4.1) und der *integration host factor* (IHF, siehe Kap. 1.4.3) beteiligt.

1.3.2.2 Die Arginin-Fermentation

Pseudomonaden gelten allgemein als Bakterien, die nicht dazu fähig sind, eine Gärung durchzuführen (Palleroni, 1992). Trotzdem wurde für *P. aeruginosa* bereits die Fermentation der Aminosäure Arginin zur Energiegewinnung in einem anaeroben Medium ohne alternative Elektronenakzeptoren beschrieben (Vander Wauven *et al.*, 1984). Arginin wird dabei quantitativ zu Ornithin abgebaut, während ein Molekül ATP regeneriert wird (Abb. 5). Weil aber Arginin bei diesem Prozess nur zur Energiegewinnung und nicht als C-Quelle genutzt werden kann und das gebildete Ornithin wieder in das Medium ausgeschieden wird, muss dem Bakterium zum Wachstum eine alternative C-Quelle oder ein komplexes Medium angeboten werden (Vander Wauven *et al.*, 1984).

Allerdings kann *P. aeruginosa* unter diesen fermentativen Bedingungen nur noch sehr langsam wachsen: Auf anaerob inkubierten Agarplatten mit Arginin im Minimalmedium sind z.B. erst nach 4-5 Tagen Kolonien zu sehen (Vander Wauven *et al.*, 1984).

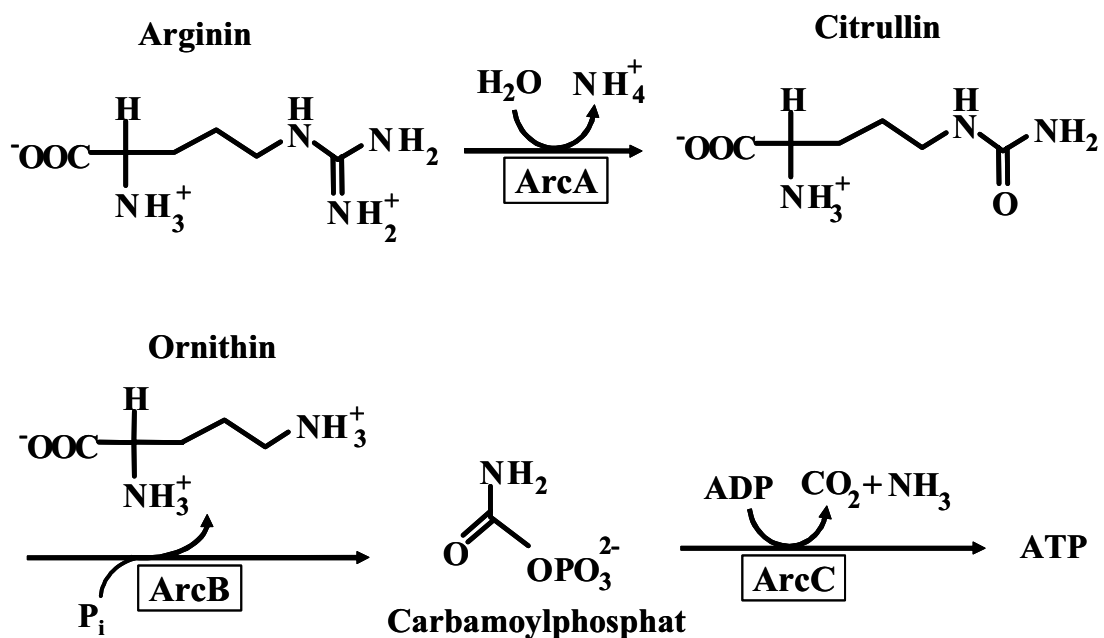


Abb. 5 Arginin-Fermentation von *P. aeruginosa* im anaeroben Medium ohne Elektronenakzeptoren (Abbildung modifiziert nach Winteler *et al.*, 1996).

Pro Arginin-Molekül wird nur ein Molekül ATP gebildet. ArcA, Arginin Deiminase; ArcB, katabolische Ornithin-Carbamoyl-Transferase; ArcC, Carbamat Kinase.

1.3.3 Pathogenität von *Pseudomonas aeruginosa*

Obwohl *P. aeruginosa* ubiquitär in terrestrischen und aquatischen Habitaten vorkommt, ist es gleichzeitig ein wichtiges opportunistisches Pathogen für Pflanzen, Tiere und den Menschen. Der Erreger ist verantwortlich für Harnwegs-, Atemwegs- und Wundinfektionen sowie Meningitis. Eine *P. aeruginosa*-Infektion ist schwer zu behandeln, da das Pathogen auf natürliche Weise resistent gegen eine Vielzahl von Antibiotika, Desinfektionsmittel und Detergentien ist.

Besonders hervorzuheben ist seine Rolle bei der Cystischen Fibrose (CF, *Cystic Fibrosis*), die auch als Mucoviscidose bezeichnet wird. Bei dieser Erbkrankheit ist das CFTR-Gen (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) mutiert. Dadurch kommt es in den Epithelzellen zu einer Störung des Chloridionen-Transporters, welche in einer erhöhten Viskosität aller Körpersekrete der betroffenen Patienten resultiert. Bei der Cystischen Fibrose ist eine chronische Lungeninfektion durch pathogene *P. aeruginosa*-Stämme die häufigste Todesursache.

Ein neues Modell für einen möglichen Mechanismus der Pathogenese bei Patienten mit Cystischer Fibrose wurde von Worlitzsch *et al.* (2002) beschrieben (siehe Abb. 6). Das wichtige Ergebnis dieser neuen Untersuchungen ist, dass *P. aeruginosa* sich zu Beginn der Lungeninfektion eines CF-Patienten an das dort vorherrschende anaerobe Milieu adaptiert (siehe Erläuterungen zu Abb. 6 b-e). Wenn sich die *P. aeruginosa*-Zellen letztendlich zu „Makrokolonien“ zusammengeschlossen haben (Abb. 6 f), sind sie vor der Immunabwehr geschützt und auch nur noch sehr schwer mit den derzeit verfügbaren Antibiotika zu bekämpfen.

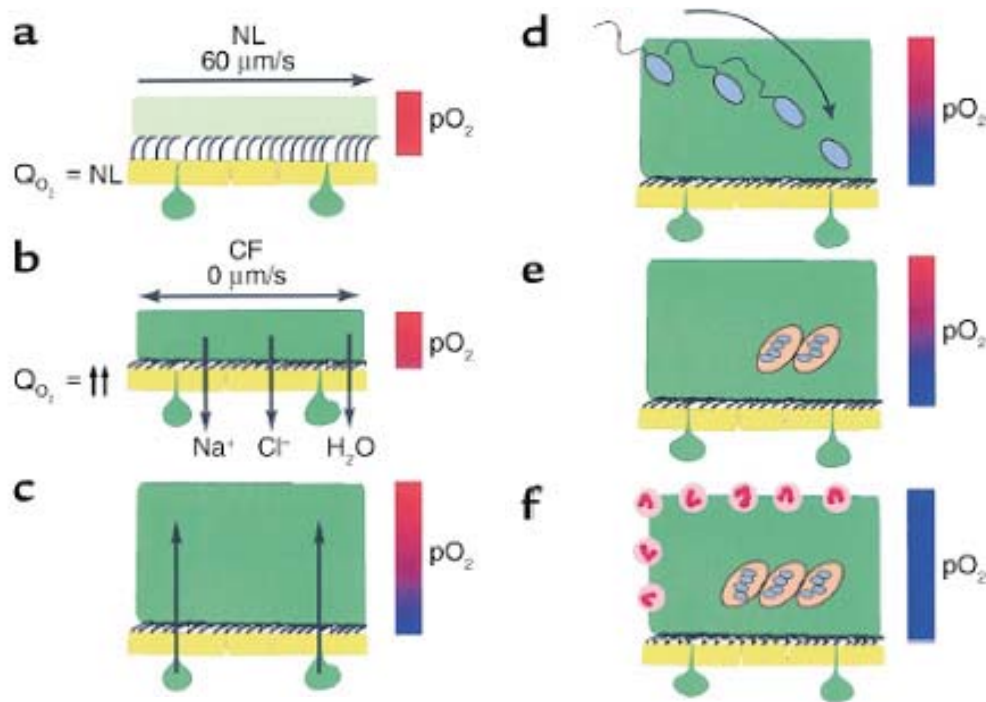


Abb. 6 Schematisches Modell der pathologischen Ereignisse, welche zu einer chronischen *P. aeruginosa*-Infektion in den Lungen bei Patienten mit Cystischer Fibrose führen (aus Worlitzsch *et al.*, 2002).

a) Auf den Epithelzellen der Lungen eines gesunden Menschen liegt eine dünne und leicht-viskose Schleimschicht (hellgrün). Die Flimmerhärchen transportieren den Schleim mitsamt der darin enthaltenen Fremdkörper nach draußen (durch den waagrechten Pfeil dargestellt) und reinigen damit die Oberfläche der Epithelzellen. Ein normaler Sauerstoff-Verbrauch der Epithelzellen führt zu keinem Sauerstoffgradienten innerhalb der dünnen Schleimschicht (durch den roten Balken dargestellt).

b)-f) Lungenepithelzellen eines CF-Patienten.

b) Die starke Salz- und Wasseraufnahme durch die krankhaft veränderten Epithelzellen von CF-Patienten führt zu einer dünnen, aber dickflüssigen Schleimschicht, welche auf die Flimmerhärchen drückt. Dadurch kommt der Schleim-Transport zum Stillstand (dargestellt durch den waagrechten Doppelpfeil). Trotz des erhöhten Sauerstoff-Verbrauches, der durch den verstärkten Ionentransport der CF-Epithelzellen verursacht wird, kommt es noch nicht zu einem Sauerstoff-Gradienten innerhalb der dünnen Schleimschicht.

c) Die anhaltende Sekretion von Schleim, der nicht abtransportiert wird, resultiert in einem immer dicker werdenden Schleimpfropfen. Jetzt erst führt der erhöhte Sauerstoff-Verbrauch der CF-Epithelzellen zu einem starken Sauerstoff-Gradienten (roter Teil des Balken: aerober Bereich; blauer Teil: anaerober Bereich) innerhalb der verdickten Schleimschicht.

d) *P. aeruginosa*-Zellen, die auf die Oberfläche der Schleimschicht gelangen, penetrieren diese aktiv mit Hilfe ihrer Flagellen, um zu den anaeroben Zonen zu gelangen.

e) *P. aeruginosa*-Zellen adaptieren sich an diese anaerobe Nische innerhalb der Schleimschicht, indem sie ihren Energiestoffwechsel umstellen, Alginate bilden und sich zu „Makrokolonien“ zusammenschließen.

f) Die zunehmende Dichte der *P. aeruginosa*-Makrokolonien führt zu einem strikt anaeroben Milieu innerhalb der Schleimschicht (blauer Balken). Die Makrokolonien können nun der Immunabwehr widerstehen. Die Neutrophilen (als rote V-förmige Zellen dargestellt) können z.B. gar nicht erst zu den im anaeroben Milieu lebenden *P. aeruginosa*-Makrokolonien vordringen.

1.3.4 Neue Erkenntnisse aus dem *Pseudomonas*-Genomprojekt

Das gesamte Chromosom von *P. aeruginosa* ist sequenziert und die Daten sind über das Internet zugänglich (www.pseudomonas.com, Stover *et al.*, 2000).

Die genetische Komplexität von *P. aeruginosa* erreicht mit seinen 5570 offenen Leserastern (ORFs, *open reading frames*) fast die des einfachen Eukaryoten *Saccharomyces cerevisiae* mit ungefähr 6200 Proteinen. *P. aeruginosa* hat das höchste prozentuale Verhältnis an vorhergesagten regulatorischen Genen aller bisher sequenzierten bakteriellen Genome: Insgesamt 521 Gene (9.4 % aller ORFs) kodieren entweder für Transkriptions-Regulatoren oder Zwei-Komponenten-Regulationssysteme (Stover *et al.*, 2000). Solche Systeme sind zum einen nötig, um auf Änderungen der Umweltbedingungen zu reagieren, zum anderen aber auch für die Regulation der Virulenz.

Äußere Membranproteine (*outer membrane proteins*, OMPs) in *P. aeruginosa* sind von besonderem Interesse wegen ihrer Beteiligung am Transport von Antibiotika, am Export von extrazellulären Virulenz-Faktoren und beim Verankern der Strukturen, die für die Adhäsion und die Fortbewegung benötigt werden. Eine verglichen mit anderen Genomen verhältnismäßig große Anzahl von Genen (ungefähr 150) sind für OMPs in *P. aeruginosa* anhand der Sequenzdaten vorhergesagt worden (Stover *et al.*, 2000). Die Untersuchung dieser Genfamilie könnte einen bedeutenden Einfluss auf die Entwicklung von neuen Antibiotika und Impfstoffen haben.

In Übereinstimmung mit seiner metabolischen Vielseitigkeit in den unterschiedlichsten Habitaten finden sich in *P. aeruginosa* annähernd 300 cytoplasmatische Membran-Transportsysteme für Nährstoffe und andere Moleküle. Im Gegensatz zu *E. coli* besitzt das Pathogen eine große Vielfalt an Transportern für Mono-, Di- und Tricarboxylate, aber nur eine sehr beschränkte Anzahl an Zucker-Transportern. So hat *P. aeruginosa* z.B. nur zwei Phosphotransferase-Systeme für den Zucker-Transport, namentlich für Fructose und N-Acetylglucosamin, und keinen vorhergesagten Zucker-Transporter der MFS-Klasse (*major facilitator superfamily*), wohingegen es in *E. coli* jeweils mehr als 20 Vertreter dieser beiden Gruppen gibt. Dies weist auf einen grundlegend unterschiedlichen Metabolismus der Kohlenstoff-Verwertung dieser beiden Gram-negativen Bakterien hin (siehe unter 1.3.1), was durch die großen Unterschiede der besiedelten Habitate bedingt ist.

1.4 Regulatoren der Denitrifikations- und Hämbiosynthesegene in *Pseudomonas aeruginosa*

1.4.1 Die Fnr homologen Regulatoren Anr und Dnr

Der Redox-Regulator Anr (*anaerobic regulation of arginine deiminase and nitrate reduction*) ist ein Einkomponenten-Regulationssystem, das sowohl Sensor für den Redoxzustand der Zelle, als auch DNA-bindender Transkriptionsfaktor ist. Das Protein weist 51 % Sequenzidentität auf Aminosäurenebene zum bekannten Fnr (*fumerate nitrate reduction*) aus *E. coli* auf. Das C-terminale helix-turn-helix-Motiv ist fast identisch zum *E. coli*-Protein und der N-Terminus enthält die vier konservierten Cysteinreste, die in Fnr an der Bildung des [4Fe-4S]-Zentrums beteiligt sind. Über die Integrität dieses Fe-S-Zentrums wird der Redoxzustand der Zelle gemessen. Unter oxidierenden Bedingungen wird es über ein [3Fe-4S]- zu einem [2Fe-2S]-Zentrum umgebaut oder ganz zerstört. Das Protein liegt dann als Monomer vor. Unter reduktiven Bedingungen besitzt das Fe-S-Zentrum wieder eine intakte [4Fe-4S]-Struktur und der Regulator geht in seine aktive, DNA-bindende Dimerform über (Sawers *et al.*, 1991; Zimmermann *et al.*, 1991; Khoroshilova *et al.*, 1995; Green *et al.*, 1996; Lazazzera *et al.*, 1996). Bisher ist beschrieben worden, dass *P. aeruginosa* Anr dabei eine ähnliche Sequenz wie Fnr aus *E. coli* (TTGAT NNNN ATCAA) erkennt (Haas *et al.*, 1992; Winteler & Haas, 1996). In unserer Arbeitsgruppe konnte durch theoretische Analysen von 12 verschiedenen experimentell untersuchten Anr-Bindemotiven aus *P. aeruginosa* eine DNA-Matrix für die Anr-Bindestelle abgeleitet werden (Münch *et al.*, 2003). Die grafische Darstellung dieser neuen Anr-Konsensussequenz ist in Abb. 7 gezeigt.

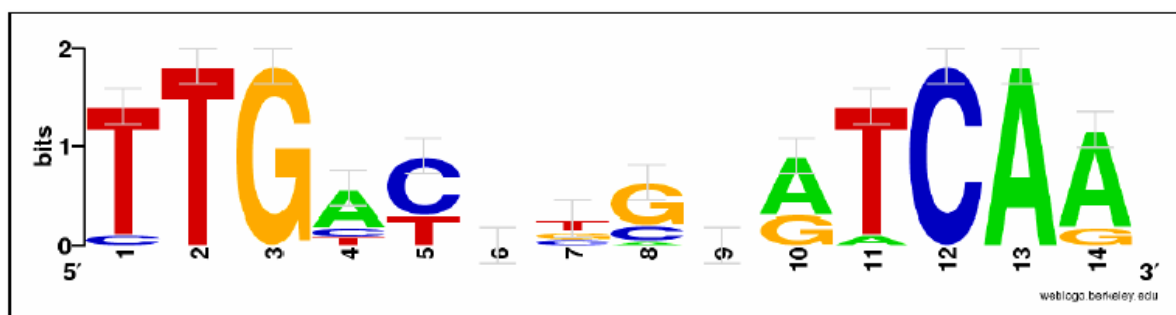


Abb. 7 Sequenz-Logo der Anr-Bindestelle in *P. aeruginosa* (aus Hiller, 2003).

Die Größe der dargestellten Nukleotide gibt die beobachtete Häufigkeit der Nukleotide an der entsprechenden Position an. Das Logo wurde aus den Informationen von 12 Literaturangaben erstellt.

Während für *E. coli* eine sehr große Zahl Fnr-regulierter Gene bekannt ist, konnten in *P. aeruginosa* bisher nur wenige Anr-abhängige Gene experimentell identifiziert werden. Dazu gehören die Gene des Arginin Deiminase-Operons (*arcDABC*, Galimand *et al.*, 1991),

die Denitrifikationsgene (*narGHI*, Krieger, 2001), die Gene der Cyanogenese (*hcnABC*, Zimmermann *et al.*, 1991) und einige Gene der Hämbiosynthese (*hemA*, Krieger *et al.*, 2002; *hemN* und *hemF*, Rompf *et al.*, 1998).

Darüber hinaus wurde in *P. aeruginosa* ein zweiter Regulator Dnr (*dissimilatory nitrate respiration regulator*) entdeckt, der auf Aminosäureebene Ähnlichkeit zu Anr aufweist. Dnr soll eine ähnliche DNA-Konsensussequenz erkennen wie Fnr und Anr, es fehlen ihm aber die konservierten Cysteinreste für die Bildung des Fe-S-Zentrums (Arai *et al.*, 1995). Es konnte gezeigt werden, dass verschiedene Denitrifikationsgene (*nirS*, *norC* und *nosZ*) über eine Anr-Dnr-Kaskade reguliert werden. Dabei nimmt Anr Veränderungen des Sauerstoffpartialdruckes wahr und aktiviert die Transkription von *dnr*. Dnr wiederum reagiert vermutlich auf N-Oxide und aktiviert die Transkription der entsprechenden Zielgene (Arai *et al.*, 1997).

1.4.2 Das Nitratsensorsystem NarXL

NarXL ist ein Zweikomponenten-Regulationssystem, dessen Sensor NarX in der Membran sitzt und bei Vorhandensein von Nitrat in der Umgebung sich selbst phosphoryliert. Dieses autophosphorylierte NarX überträgt seine Phosphatgruppe anschließend auf den Transkriptionsregulator NarL, der dadurch in der Lage ist, an DNA zu binden (Stewart, 1993). *E. coli* NarL erkennt spezifische Sequenzen im Promotorbereich der Zielgene (TACc/tNc/aT, Tyson *et al.*, 1993), bindet aber im Gegensatz zu Anr als Monomer an die DNA. In *E. coli* kommen diese Konsensussequenzen oft als invertierte Wiederholungen vor, die dann aber meist von NarP besetzt werden, einem NarL-Homolog, welches in *P. aeruginosa* nicht vorhanden ist.

In *E. coli* übernimmt NarXL die Feinregulierung der von Fnr unter Sauerstoffmangel induzierten Gene. Bei Vorhandensein von Nitrat schaltet es alle anaeroben Funktionen wieder ab, die nicht für die Nitratatmung benötigt werden. Auf der anderen Seite stimuliert es zusätzlich die Transkription der Gene der Nitratammunifikation. So wurde gezeigt, dass die Gene der Fumaratreduktase (Kalman & Gunsalus, 1988 und 1989), die DMSO/TMAO-Reduktase (Cotter & Gunsalus, 1989), die Formiat-abhängige Nitritreduktase (Hussain *et al.*, 1994), die Alkohol-Dehydrogenase und die Pyruvat-Formiat-Lyase (Kaiser & Sawers, 1995) reprimiert werden, während die Transkription der Gene der Nitratreduktase, der NADH-abhängigen Nitritreduktase (Spiro & Guest, 1990) und der Formiat-Dehydrogenase (Darwin & Stewart, 1995) induziert wird.

1.4.3 Der DNA-biegende *integration host factor* (IHF)

Das bakterielle IHF ist ein heterodimeres Protein (HimAD), welches durch Bildung höhergeordneter DNA-Strukturen an der Regulation der Expression zahlreicher Gene beteiligt ist (Friedmann, 1988). IHF bindet an die DNA und induziert durch Biegung eine Veränderung der Topologie der DNA. Für die DNA-Bindung wurden mehrfach Konsensussequenzen publiziert (Craig & Nash, 1984; Kur *et al.*, 1989; Goodrich *et al.*, 1990; Oppenheim *et al.*, 1993). IHF gehört in die Klasse der Histon-ähnlichen Proteine und konnte bisher in vielen Gram-negativen Bakterien nachgewiesen werden. Die zwei Untereinheiten des Proteins werden durch die Gene *himA* und *himD* kodiert.

Den Name *integration host factor* hat das Protein daher erhalten, weil es vom Phagen Lambda benötigt wird, um seine DNA in das Chromosom von *E. coli* zu integrieren. Daneben sind mittlerweile viele weitere zelluläre Prozesse außer der Genregulation beschrieben, an denen IHF beteiligt ist. Dazu gehören Rekombination, Transposition, Inversion, Phagen-DNA-Verpackung und Plasmid-DNA-Replikation (Friedmann, 1988).

In *P. aeruginosa* konnte ebenfalls ein Protein gereinigt werden, welches als Heterodimer vorliegt und IHF-Aktivität aufweist (Delic-Attree *et al.*, 1995). Es wurde gezeigt, dass dieses Protein an der Regulation der Alginatbiosynthese (Delic-Attree *et al.*, 1996; Wozniak & Ohman, 1993; Wozniak, 1994) und Hämbiosynthese (Krieger *et al.*, 2002) beteiligt ist.

1.4.4 Die Katabolit-Regulation

Wenn Bakterien mehrere Kohlenstoffquellen gleichzeitig zur Verfügung stehen, so benutzen sie zuerst diejenige, mit der sie mittels ihres spezifischen Stoffwechsels die höchste Energieausbeute erzielen können. Erst nach Verbrauch ihres bevorzugten Substrats wechselt der Organismus zum Katabolismus anderer vorhandener C-Quellen. Beim Übergang von der Nutzung der ersten Kohlenstoffquelle zur zweiten ist eine Unterbrechung der Zellteilung zu beobachten. Dieses biphasische Wachstum tritt deshalb auf, weil bei der Verwertung der ersten C-Quelle die Systeme zur Nutzung anderer Substrate reprimiert werden, um eine verschwenderische Zweigleisigkeit der energieproduzierenden Enzym-Systeme zu unterbinden. Diese Katabolitregulation wird in *Enterobacteriaceae* und diversen *Bacilli* bei Anwesenheit von Glucose ausgelöst. In *Enterobacteriaceae* erfolgt die Regulation über das Aktivator-Protein Crp (*cAMP receptor protein*), das auch Cap (*catabolite gene activator protein*) genannt wird. Durch Bindung des sekundären Botenstoffs cAMP, der bei

Glucosemangel produziert wird, dimerisiert Crp und bindet zur Transkriptionsaktivierung an die Promotorregionen der Zielgene.

In *P. aeruginosa* ist der Mechanismus der Katabolit-Regulation noch sehr wenig untersucht. Offensichtlich unterscheidet er sich aber von dem in *Enterobacteriaceae*, denn weder cAMP noch ein Crp-Analog scheinen daran beteiligt zu sein. *P. aeruginosa* bevorzugt nicht Glucose, sondern organische Säuren und davon hauptsächlich Zwischenprodukte des Citratzyklus (Succinat, 2-Ketoglutarat, Citrat, Malat, Fumarat). Diese werden vor anderen Substraten wie Mannitol, Fructose oder Glycerin genutzt. Dagegen haben Pyruvat, Lactat oder Glutamat keine Katabolit-regulatorische Wirkung. Bisher konnte nur das Gen *crc* (*catabolite repression control*) identifiziert werden, dessen Produkt an der Katabolitrepressions-Kontrolle beteiligt ist. *crc*-Mutanten sind nicht mehr in der Lage, in Anwesenheit von Intermediaten des Citratzyklus die Verwertung anderer C-Quellen zu unterdrücken (Wolff *et al.*, 1991; MacGregor *et al.*, 1991).

Der Einfluss von Crc scheint sich nicht nur auf die Wahl der genutzten Kohlenstoffquelle zu beschränken. O'Toole (1999) konnten in *P. aeruginosa* einen Einfluss dieses Proteins auf die Ausbildung von Biofilmen nachweisen. Trotz aller bisher bekannten Regulationen, die von Crc beeinflusst werden, ist der Mechanismus der Wirkungsweise noch immer unklar.

1.5 Proteomanalyse

Der Begriff "Proteom" wurde im Jahre 1994 durch Marc Wilkins und Keith Williams geprägt. Abgeleitet wurde er aus den beiden Wörtern "PROTEin" und "genOME". Das Proteom bezeichnet die Gesamtheit aller Proteine, die zu einem bestimmten Zeitpunkt einer Zelle oder eines Organismus unter definierten Bedingungen gebildet werden. Im Gegensatz zum Genom ist das Proteom daher nicht statisch, sondern verhält sich in Abhängigkeit von Umwelteinflüssen sehr dynamisch und flexibel (siehe Abb. 8).

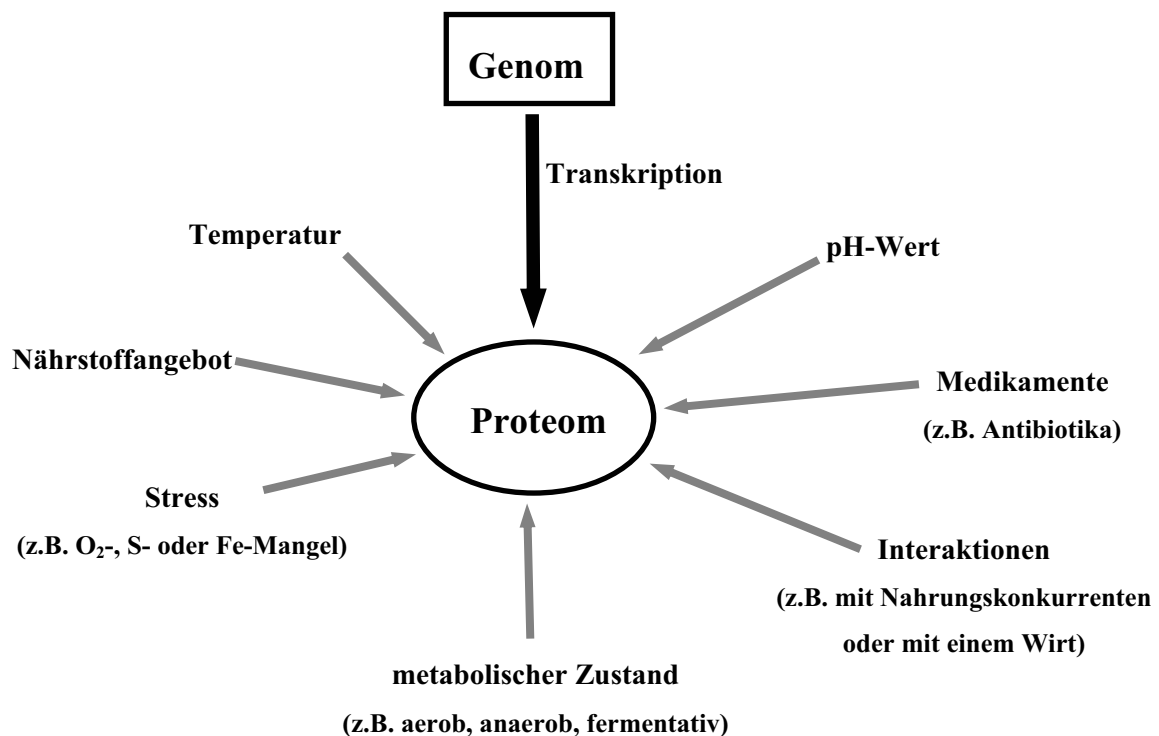


Abb. 8 Abhängigkeit der Proteinexpression von den verschiedenen Umwelteinflüssen.

Die Proteomanalyse stellt eine wichtige Ergänzung zur Genomanalyse dar, denn das komplexe Netzwerk der Zellregulation lässt sich nicht allein durch die Entschlüsselung genomischer DNA eines Organismus charakterisieren. Dies wird deutlich, wenn man den biologischen Informationsfluss vom Gen zum funktionstüchtigen Protein betrachtet. Komplexe Prozesse wie die Transkription der DNA-Sequenz, die Translation der mRNA in Protein, dessen Transport zum Wirkort, die post-translationale Modifikation und der Abbau des Proteins werden durchlaufen. Die Menge an Proteinen in der Zelle sowie die Modifikation eines Proteins kann nicht automatisch vom Gen oder der mRNA abgeleitet werden, sondern hierzu sind proteinspezifische Untersuchungen erforderlich. Die Proteomanalyse eröffnet

somit die Möglichkeit der Identifizierung von Proteinen, der Charakterisierung post-translationaler Modifikationen und der Funktionsbeschreibung von Proteinen, Proteingruppen und ihrer Beziehung untereinander. Heute wird dies hauptsächlich mit Hilfe von zwei Techniken erreicht. Mit der zwei-dimensionalen Gelelektrophorese werden die Proteine getrennt und die Proteinidentifizierung sowie Charakterisierung erfolgt durch die massenspektrometrische Analyse.

Durch die Verbindung und den Vergleich experimenteller Daten aus Genom-, Transkriptom- und Proteomanalysen wird ein ständig wachsender detaillierterer Einblick in das genetische, metabolische und physiologische Potential von Organismen gewonnen. Dies gibt Aufschluss über den Mechanismus der Anpassungsfähigkeit der untersuchten Organismen an bestimmte Lebensräume und der Reaktion auf Umweltveränderungen.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Durch *in silico*-Analysen des *P. aeruginosa*-Genoms, basierend auf den detaillierten Kenntnissen des *E. coli*-Metabolismus, sollten neue Gene für bisher unbekannte Fermentationswege in *P. aeruginosa* identifiziert werden. Dieses erste Fermentations-Modell für *P. aeruginosa* sollte anschließend experimentell verifiziert und gegebenenfalls korrigiert werden. Dabei sollten die Fermentationsprodukte in den Kulturmedien mittels HPLC-Analysen sowohl identifiziert als auch quantifiziert werden. Durch Mutationsstudien sollten die Gene den beteiligten Enzymen zugeordnet werden. Weiterhin galt es, die Expression der identifizierten Gene aufzuklären. So sollten beteiligte Umweltfaktoren und zugehörige Regulatoren der Fermentationsprozesse identifiziert werden.

Ein potentieller Kandidat für einen beteiligten Regulator war der Sauerstoffregulator Anr. Deshalb sollte in einem zweiten Teil der Arbeit eine globale Untersuchung zur Regulation des anaeroben Stoffwechsel von *P. aeruginosa* durch Anr mit Hilfe von Proteomics-Methoden durchgeführt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ALA	5-Aminolävulinsäure
Ap	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaare (<i>base pairs</i>)
BCA	Bicinchonininsäure (<i>bicinchoninic acid</i>)
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
Cb	Carbenicillin
CFU	Anzahl gebildeter Kolonie (<i>colony forming units</i>)
CHAPS	3-[(3Cholamidopropyl)-dimethyl-amino]-Propansulfat
Cm	Chloramphenicol
CoA	Coenzym A
Da	Dalton
dH ₂ O	Deionisiertes Wasser
DMF	N, N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
DTT	Dithiotreitol
dNTP	2'-Desoxynukleosid (A-, C-, G-, T-) -5'-triphosphat
E _λ	Extinktion bei der Wellenlänge λ nm
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (<i>ethylenediaminetetra-acetic acid</i>)
Gm	Gentamycin
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IPTG	Isopropyl-β-galaktopyranosid
LB	Luria-Bertani
MCS	Multiple Klonierungsstelle (<i>multiple cloning site</i>)
M _r	Relative molekulare Masse
milliQ-H ₂ O	Reinstwasser
MU	Relative Einheit der β-Galaktosidaseaktivität (Miller units)

NADH	Nicotinamid-adenosin-dinukleotid (reduzierte Form)
OD _λ	Optische Dichte bei der Wellenlänge λ nm
ORF	Offenes Leseraster (<i>open reading frame</i>)
oNPG	o-Nitrophenyl-β-galaktopyranosid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
RI	Brechungsindex (<i>refraction index</i>)
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
RuBPS	Ruthenium-II-bathophenanthrolin-disulfonat
SAP	Alkalische Phosphatase aus Garnele (<i>shrimp alkaline phosphatase</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecylsulfate</i>)
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TE	Tris-EDTA
Tc	Tetracyclin
™	Eingetragenes Warenzeichen (<i>trade mark</i>)
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Units
UV	Ultraviolett
(v/v)	Volumen pro Volumen (<i>volume per volume</i>)
(w/v)	Gewicht pro Volumen (<i>weight per volume</i>)
XGal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β- galaktopyranosid
X ^R /X ^S	Resistent/sensitiv in Bezug auf die Substanz X
WT	Wildtyp (<i>wild type</i>)

2.2 Geräte und Chemikalien

2.2.1 Geräte

<i>Agarosegel-Elektrophorese</i>	Agagel Mini	Biometra
<i>Agarosegel-Dokumentation</i>	ChemiDoc	Biorad
<i>Autoklav</i>	3850 EL	Systec
	LVSA 50/70	Zirbus Technology
<i>Elektroporation</i>	Gene Pulser II mit Pulse Controller Plus	Biorad
<i>Fluoreszenzmikroskop</i>	Axioskop	Zeiss
<i>Fluoreszenzscanner</i>	Molecular Imager FX	Biorad
<i>HPLC-Anlage</i>	HPLC System	Jasco
mit <i>Brechungsindex-Detektor</i> (RI-1530), <i>Photodiodenarray-Detektor</i> (MD-1515), <i>Fluoreszenz-Detektor</i> (FP-1520), <i>Pumpe</i> (PU-1580), <i>Gradientenmischer</i> (LG-1580-04), <i>Inline-Entgaser</i> (DG-1580-54), <i>Autoinjektor</i> (AS-1555) und <i>Säulenofen</i> (CO-1560)		
<i>IEF-Gerät</i>	Protean IEF Cell	Biorad
<i>Lumineszenz-Spektrometer</i>	LS50B	Perkin Elmer
<i>pH-Messgerät</i>	pH-Meter CG 842	Schott
<i>Photometer</i>	Ultrospec 2000	Amersham Pharmacia
<i>Reinstwasseranlage</i>	Purelab Plus UV/UF	USF
<i>SDS-PAGE-Apparatur</i>	Mini Protean II	Biorad
	Criterion	Biorad
	Ettan Dalt II System	Amersham Pharmacia
<i>Sterile Werkbank</i>	Hera safe	Hera
<i>Thermocycler</i>	T personal	Biometra
	T Gradient	Biometra
<i>Thermomixer</i>	Thermomixer compact	Eppendorf
<i>Ultraschallbad</i>	USR57	Merck
<i>Ultraschall-Zellaufschluß</i>	HD 2070/UW 2070	Bandelin
<i>UV/VIS-Spektrometer</i>	Lambda 2	Perkin Elmer
<i>Waagen</i>	Präzisionswaage SBA 52	Scaltec
	Feinwaage BP61S	Sartorius
<i>Wasserbadschüttler</i>	Aquatron	Infors

<i>Zentrifugen</i>	Mini spin	Eppendorf
	Biofuge fresco	Heraeus
	Megafuge 1.0 R	Heraeus
	RC 5B Plus	Sorvall
	Ultrazentrifuge L7-65	Beckman
	Speedvac SPD101B mit Kühlfalle RVT400	Savant

2.2.2 Chemikalien und Materialien

DNA-Isolierungs-Säulen	Qiagen (Hilden)
Kulturmedien	Difco (Augsburg)
	Serva (Heidelberg)
Molekularbiologische Enzyme	MBI Fermentas (St. Leon Roth)
	Amersham Pharmacia (Freiburg)
	Boehringer (Mannheim)
Oligonukleotide	MWG (Ebersberg)
	Metabion (München)
PCR-Kit	Qiagen (Hilden)
PCR-Produkt-Reinigungs-Kit	Qiagen (Hilden)
Gel-Extraktions-Kit	Qiagen (Hilden)
Sterilfilter	Millipore (Eschborn)
IEF-Streifen	Amersham Pharmacia (Freiburg)
	Biorad (München)
BacLight-Kit	Molecular Probes, MoBiTec (Göttingen)
Proteinbestimmungs-Kit	Amersham Pharmacia (Freiburg)

Die hier nicht gesondert aufgeführten Chemikalien und Reagenzien wurden von den folgenden Firmen mit dem Reinheitsgrad „p.a.“ oder „reinst“ bezogen: Fluka (Buchs, Schweiz), Merck (Darmstadt), Riedel-de-Haen (Seelze), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) oder Sigma-Aldrich (Steinheim).

2.3 Bakterienstämme und Plasmide

Stamm	Beschreibung	Referenz/Quelle
<u><i>Escherichia coli</i></u>		
DH5 α	<i>F</i> λ <i>supE44</i> Δ (<i>argF-lac</i>)U169 Φ 80 <i>dlacZ</i> Δ M15 <i>hsdR17</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>gyrA96</i> <i>thi-1</i> <i>relA1</i>	Hanahan, 1983
DH10B	<i>F</i> <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ 80 <i>dlacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74</i> <i>deoR</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>araD139</i> Δ (<i>ara</i> , <i>leu</i>)7697 <i>galU</i> <i>galK</i> λ <i>rpsL</i> <i>nupG</i>	Gibco®BRL
SM10	<i>thi-1</i> <i>thr</i> <i>leu</i> <i>tonA</i> <i>lacY</i> <i>supE</i> <i>recA</i> ::RP4-2-Tc::Mu, Km ^R	de Lorenzo & Timmis, 1994
<u><i>Pseudomonas aeruginosa</i></u>		
PAO1	<i>P. aeruginosa</i> Wildtyp	Dunn & Holloway, 1971
CHA	Mukoides CF-Isolat, cytotoxisch	Delic-Attree <i>et al.</i> , 1996
PAO6261	PAO1 Δ <i>anr</i>	Ye <i>et al.</i> , 1995
RM536	PAO1 <i>dnr</i> ::tet; Tc ^R	Arai <i>et al.</i> , 1995
PAO9104	PAO1 <i>narL</i> ::cat; Cm ^R	Krieger <i>et al.</i> , 2002
CHA-A2	CHA <i>himA</i> ::tet; Tc ^R	Delic-Attree <i>et al.</i> , 1996
PAO-ME1	PAO1 Δ <i>pta</i> :: <i>aacC1-gfp</i> ; Gm ^R	Diese Arbeit
PAO-ME3	PAO1 Δ <i>ldhA</i> :: <i>aacC1-gfp</i> ; Gm ^R	Diese Arbeit
PAO-ME2	PAO1 Δ <i>hemA</i> :: <i>aacC1-gfp</i> ; Gm ^R	Diese Arbeit

Plasmid	Beschreibung	Referenz/Quelle
pQF50	Reportergen-Vektor (<i>lacZ</i>) mit breitem Wirtsspektrum; Ap ^R , Cb ^R	Farinha & Kropinski, 1990
packA	pQF50 mit einem 297 bp langen Fragment des <i>ackA</i> -Promotors	Diese Arbeit
pEX18Ap	„Gene replacement“-Vektor mit MCS aus pUC18; Ap ^R , <i>oriT</i> ⁺ , <i>sacB</i> ⁺	Hoang <i>et al.</i> , 1998
pPS858	Plasmid mit Gentamycin-GFP-Kassette (<i>aacC1-gfp</i>), welche von FRT-Bindestellen flankiert ist; Ap ^R , Gm ^R	Hoang <i>et al.</i> , 1998
pMEP1	pEX18Ap mit einem <i>Bam</i> HI- <i>Hind</i> III verdauten PCR-Fragment (2149 bp) des <i>pta</i> -Gens; Ap ^R	Diese Arbeit
pMEP5	pEX18Ap mit einem <i>Bam</i> HI- <i>Hind</i> III verdauten PCR-Fragment (1891 bp), welches das 3'-Ende von <i>gacS</i> , das komplette <i>ldhA</i> -Gen und die Sequenz stromabwärts von <i>ldhA</i> trägt; Ap ^R	Diese Arbeit
pMEP3	pEX18Ap mit einem <i>Bam</i> HI- <i>Sph</i> I verdauten PCR-Fragment (1025 bp) des <i>hemA</i> -Gens; Ap ^R	Diese Arbeit
pMEP2	pMEP1 mit einer 288 bp <i>Sal</i> I-Deletion im <i>pta</i> -Gen, welche mit einem <i>aacC1-gfp</i> -Fragment (Gm ^R + GFP) aus pPS858 ersetzt wurde; Ap ^R , Gm ^R	Diese Arbeit
pMEP11	pMEP5 mit einer 726 bp <i>Sda</i> I-Deletion im <i>ldhA</i> -Gen, welche mit einem <i>aacC1-gfp</i> -Fragment aus pPS858 ersetzt wurde; Ap ^R , Gm ^R	Diese Arbeit
pMEP4	pMEP3 mit einer 69 bp <i>Sal</i> I-Deletion im <i>hemA</i> -Gen, welche mit einem <i>aacC1-gfp</i> -Fragment aus pPS858 ersetzt wurde; Ap ^R , Gm ^R	Diese Arbeit

2.4 Medien und Medienzusätze

2.4.1 Komplexmedium

Als Komplexmedium wurde für alle Bakterien LB verwendet. Für feste Medien wurden zusätzlich 15 g Agar pro Liter zugesetzt.

LB-Medium	Trypton	10 g/l
	Hefe-Extrakt	5 g/l
	NaCl	5 g/l

2.4.2 Minimalmedium M9

Das Minimalmedium M9 wurde angesetzt, wie in Sambrook *et al.* (1989) beschrieben. Aus einer 5-fach konzentrierten Salzlösung wurde das 1-fach konzentrierte Medium hergestellt, zu welchem nach dem Sterilisieren noch Magnesiumsulfat, Calciumchlorid und die Kohlenstoff-Quelle gegeben wurden.

5 x M9-Salze	Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	64.0 g
	KH ₂ PO ₄	15.0 g
	NaCl	2.5 g
	NH ₄ Cl	5.0 g
	milliQ-H ₂ O	1000 ml
M9-Medium	5 x M9-Salze	200 ml
	milliQ-H ₂ O	780 ml
	1 M MgSO ₄	2 ml
	100 mM CaCl ₂	1 ml
	2 M C-Quelle	20 ml

2.4.3 OS-Minimalmedium für *Pseudomonas aeruginosa*

Das OS-Minimalmedium nach Ornston & Stanier (1966) wurde mit den gleichen Modifikationen angesetzt, wie in Vander Wauven *et al.* (1984) beschrieben. 100 ml OSA/C wurden zu 850 ml H₂O gegeben und autoklaviert. Danach wurden je 10 ml der sterilfiltrierten Lösungen OSB und OSD sowie 1 ml OSE und als Kohlenstoff-Quelle je nach Erfordernis Glucose, Gluconat oder Pyruvat in den jeweils angegebenen Konzentrationen steril zugesetzt. Die vier Salzlösungen (siehe unten) müssen getrennt angesetzt und gelagert werden, um die Bildung und das Ausfallen schwer löslicher Salze zu vermeiden.

Wenn im Text angegeben, wurde dieses definierten OS-Minimalmedium vor dem Autoklavieren zusätzlich noch mit 2.5 g/l Hefe-Extrakt versetzt.

OSA/C	Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	201 g	OSE	EDTA	625 mg
	KH ₂ PO ₄	34 g		HCl _{konz.}	6 Tropfen
	(NH ₄) ₂ SO ₄	10 g		ZnSO ₄ ·7H ₂ O	2.74 g
	milliQ-H ₂ O	1000 ml		FeSO ₄ ·7H ₂ O	1.25 g
OSB	MgSO ₄ ·7H ₂ O	59.5 g		MnCl ₂ ·4H ₂ O	451 mg
	milliQ-H ₂ O	500 ml		CoCl ₂ ·6H ₂ O	51.3 mg
OSD	CaCl ₂ ·2H ₂ O	4.4 g		CuSO ₄ ·5H ₂ O	97.5 mg
	FeSO ₄ ·7H ₂ O	100 mg		H ₃ BO ₃	29.2 mg
	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	10 mg		NiCl ₂ ·6H ₂ O	325 mg
	milliQ-H ₂ O	500 ml		milliQ-H ₂ O	250 ml

2.4.4 Zusätze und Antibiotika

Zusätze wie Salze, XGal und Antibiotika (Tab. 1) wurden als konzentrierte Stammlösungen angesetzt und sterilisiert oder sterilfiltriert. Die Substanzen wurden den autoklavierten und danach auf ungefähr 50 °C abgekühlten Medien zugesetzt.

Für denitrifizierendes Wachstum wurden 50 mM KNO₃ zugegeben. Um LacZ⁺-Kolonien auf Agarplatten identifizieren zu können, wurde dem Medium 2 ml/l einer XGal-Lösung (20 mg/ml in DMF) zugefügt.

Tab. 1 Verwendete Antibiotika und bakterienabhängige Endkonzentrationen

Antibiotika	Stammlösung	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Ampicillin	100 mg/ml in dH ₂ O	100 µg/ml	-
Carbenicillin	100 mg/ml in dH ₂ O	-	500 µg/ml
Chloramphenicol	34 bzw. 100 mg/ml in Ethanol	34 µg/ml	500 µg/ml
Gentamycin	10 bzw. 33 mg/ml in dH ₂ O	10 µg/ml	200 µg/ml
Tetracyclin	10 bzw. 200 mg/ml in Ethanol	5 µg/ml	200 µg/ml

2.5 Mikrobiologische Techniken

2.5.1 Sterilisation

Soweit nicht anders angegeben, wurden sämtliche Medien und Puffer für 20 Minuten bei 120 °C und 1 bar Überdruck dampfsterilisiert. Temperaturempfindliche Substanzen wurden sterilfiltriert (Porendurchmesser des Filters: 0.2 µm) und Glaswaren mindestens 3 Stunden bei 180 °C hitzesterilisiert.

2.5.2 Bestimmung der Zellzahl

2.5.2.1 Optische Dichte im Photometer

Die Zelldichte einer Bakterienkultur wurde durch Messung der optischen Dichte bei 578 nm bestimmt. Eine OD₅₇₈ von eins entspricht dabei ungefähr einer Zellzahl von 1×10^9 Zellen pro ml.

2.5.2.2 Bestimmung der Lebendzellzahl mittels gewachsener Kolonien (CFU) auf LB-Agar

Von den Fermentationskulturen wurde neben der OD₅₇₈ auch die Lebendzellzahl bestimmt. Dazu wurde ein Aliquot der Kultur aseptisch entnommen und eine Verdünnungsreihe mit PBS-Puffer hergestellt. Ausgehend von der abgeschätzten Zellzahl wurden je zwei aufeinander folgende Verdünnungen auf LB-Agarplatten ausplattiert und bei 37 °C für 24 – 48 Stunden aerob inkubiert. Die gewachsenen Kolonien wurden ausgezählt und auf 1 ml Wachstumsmedium hochgerechnet. Dies ergab die CFU (*colony forming units*) pro ml Zellkultur.

PBS-Puffer	NaCl	137 mM
	KCl	2.7 mM
	Na ₂ HPO ₄ / KH ₂ PO ₄	10 mM / 2 mM (pH 7.2)

2.5.2.3 Lebendfärbung von Bakterien

Die *P. aeruginosa*-Zellen wurden mit den zwei Fluoreszenzfarbstoffen des *LIVE/DEAD*[®] *BacLight Bacterial Viability Kits* nach Angaben des Herstellers (Molecular Probes) angefärbt. Diese beiden Farbstoffe unterscheiden sich in ihrer Fähigkeit, durch die Zellmembran in das Cytoplasma von Bakterienzellen zu gelangen. Der eine Farbstoff (SYTO 9; Anregungsmaximum = 480 nm, Emissionsmaximum = 500 nm), der grün fluoresziert und an die DNA

bindet, färbt generell alle Bakterien an – sowohl solche mit intakter als auch solche mit beschädigter Zellmembran. Im Gegensatz dazu penetriert der andere Fluoreszenzfarbstoff (Propidium-Iodid; Anregungsmaximum = 490 nm, Emissionsmaximum = 635 nm), der rot fluoresziert und ebenfalls an die DNA bindet, nur Bakterien mit beschädigter Zellmembran. Dies führt dann zu einer Reduktion der Fluoreszenz von SYTO 9, wenn beide Farbstoffe gleichzeitig an die DNA einer Zelle binden. Wird also eine Bakteriensuspension mit der Farbstoffmischung des *BacLight Kits* angefärbt, dann fluoreszieren Bakterien mit einer intakten Zellmembran grün, während Bakterien mit defekter Zellmembran rot fluoreszieren.

Die mikroskopische Detektion der angefärbten *P. aeruginosa*-Zellen erfolgte mit dem Photomikroskop „Axiophat“ (Carl Zeiss, Oberkochen) mit Fluoreszenzeinrichtung. Damit konnten lebende Zellen mit grüner Fluoreszenz von toten Zellen mit roter Fluoreszenz direkt visuell voneinander unterschieden werden.

2.5.3 Wachstumsbedingungen

2.5.3.1 Bakterienkulturen unter aeroben und anaeroben Bedingungen

Aerobe Bakterienkulturen wurden bei 37 °C in Schikanekolben bei 200 rpm geschüttelt oder mit Hilfe von Reagenzglasrollern inkubiert. Die Inkubationszeiten wurden entsprechend den Experimenten variiert und sind jeweils angegeben.

Für anaerobe Bakterienkulturen wurden aerobe Vorkulturen mit einer Einzelkolonie inokuliert und bei 37 °C und 200 rpm über Nacht geschüttelt. Von diesen wurden dann anaerobe Bakterienkulturen mit der gewünschten OD₅₇₈ inokuliert und in druckbeständigen Glasflaschen mit Silikongummistopfen ebenfalls bei 37 °C und 100 rpm inkubiert. In Vergleichsexperimenten wurde mittels Sauerstoffelektrode festgestellt, dass der Sauerstoff nach 5 bis 10 min komplett verbraucht war.

2.5.3.2 Anaerobe Fermentationsansätze mit *Pseudomonas aeruginosa*

Für die anaeroben Fermentationsansätze wurden aerobe Vorkulturen mit einer Einzelkolonie beimpft und über Nacht bei 37 °C und 200 rpm schüttelnd inkubiert. Für die folgenden anaeroben Kulturen wurden zwei verschiedene Methoden verwendet. Zum einen wurde die Kulturmenge der Vorkultur, die zur Einstellung einer OD₅₇₈ von 0.3 in der Endkultur ausreichte, aus den aeroben Kulturen entnommen. Die Zellen wurden bei RT für 10 Minuten bei 3500 g zentrifugiert, das Zellsediment in 10 ml Voll- oder Minimalmedium resuspendiert

und nochmals zentrifugiert. Nach diesem Waschschrift wurden die Zellen in Voll- oder Minimalmedium resuspendiert und in die vorbereiteten Anaerobflaschen mit vorgelegtem Substrat überführt und bei 37 °C inkubiert. Zum anderen wurden von den aeroben Vorkulturen frische 150 ml Hauptkulturen mit einer OD₅₇₈ von 0.05 angesetzt und aerob bei 37 °C und 200 rpm bis zu einer OD₅₇₈ von 0.3 inokuliert, anschließend direkt in die vorbereiteten Anaerobflaschen überführt und bei 37 °C inkubiert.

2.5.4 Glycerinkulturen

Zur längerfristigen Aufbewahrung von Bakterien wurden Glycerinkulturen hergestellt. Dazu wurden entweder 850 µl von einer Bakterien-Übernachtskultur mit 150 µl sterilem 100 %igem Glycerin gemischt oder die Bakterien wurden mit einer Impföse von einer Agarplatte steril abgenommen und in 1 ml LB mit 15 % Glycerin suspendiert und bei -80 °C gelagert.

2.6 Molekularbiologische Methoden

Die Protokolle der meisten beschriebenen molekularbiologischen Methoden basieren auf Sambrook *et al.* (1989). Plasmide und DNA-Fragmente wurden in milliQ-H₂O oder TE-Puffer bei -20 °C gelagert.

TE-Puffer	Tris-HCl (pH 8.0)	10 mM
	EDTA	1 mM

2.6.1 Präparation genomischer DNA

Zur Präparation chromosomaler DNA wurden 50 ml Übernacht-Kultur von *P. aeruginosa* bei 8000 g und 4 °C für 15 Minuten zentrifugiert. Das Sediment wurde in 7 ml S-EDTA (150 mM NaCl, 100 mM EDTA) resuspendiert und nach Zugabe einer Spatelspitze Lysozym 30 Minuten bei RT inkubiert. Durch Zugabe von 400 µl einer 25 %igen SDS-Lösung und weiterer Inkubation bei 60 °C für 10 Minuten wurden die Zellen vollständig lysiert. Das Lysat wurde mit 1.6 ml 5 M Na-Perchlorat und 10 ml Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisch (24:1) versetzt und zur vollständigen Ausfällung des Zellproteins 30 min bei 4 °C geschüttelt.

Nach 30 minütiger Zentrifugation bei 4 °C und 17 000 g wurde die obere klare Phase des Überstandes in ein neues Gefäß überführt und mit 2 Volumenteilen absolutem Ethanol überschichtet. Die an der Grenzfläche ausfallende genomische DNA wurde mit einem Glasstab aufgewickelt und in 5 ml 0.1 x SSC (15 mM NaCl, 1.5 mM Trinatriumcitrat, pH 7.0) gelöst.

2.6.2 Amplifikation von DNA-Fragmenten

Mit Hilfe der PCR (*polymerase chain reaction*) wurden verschiedene Gene und Promotorsequenzen direkt aus dem *P. aeruginosa* Chromosom amplifiziert.

Pro 100 µl Reaktionsansatz wurden etwa 20 ng chromosomale DNA, 10 µl 10 x PCR-Puffer (Amersham Pharmacia), je 20 pmol Primer, 200 µM dNTP's und 0.5 Units *Taq*-DNA-Polymerase eingesetzt. Bei unbefriedigenden Ausbeuten an PCR-Produkt wurde durch Variation der MgCl₂-Konzentration [2.5 - 4.5 mM], der DMSO-Konzentration [1-5 % (v/v)] oder durch Zugabe von 10 µl Q-Puffer der Firma Qiagen versucht, die Ausbeute zu erhöhen. Die PCR wurde nach folgendem Temperaturprogramm in einem PCR-Cycler von Biometra durchgeführt: 5 min Denaturierung der chromosomalen DNA bei 98 °C, gefolgt von 30 Zyklen mit 1-minütiger Denaturierung bei 96 °C, 1-minütiger Anlagerungszeit der Primer bei

primerabhängiger Temperatur und 1 – 3-minütiger Kettenverlängerung bei 72 °C. Der letzte 5-minütige Schritt bei 72 °C diente der vollständigen Synthese des Gegenstrangs.

Die PCR-Produkte wurden standardmäßig mit dem *PCR Purification Kit* (Qiagen) nach Angaben des Herstellers für die weiteren Reaktionen aufgereinigt.

2.6.3 Bestimmung von DNA- und RNA-Konzentration

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte durch Extinktionsmessung bei 260 nm und zur Kontrolle auf Proteinverunreinigung bei 280 nm. Eine Extinktion von 1 bei 260 nm wurde dabei einer Konzentration von 50 µg/µl dsDNA bzw. 40 µg/µl ssDNA oder RNA gleichgesetzt. Die Reinheit der DNA-Lösung ergab sich aus dem Quotienten zwischen E_{260} und E_{280} ($E_{260} / E_{280} > 1.8$ für reine DNA).

2.6.4 Das Schneiden von DNA mittels Restriktionsendonukleasen

Das Schneiden von DNA erfolgte mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen in den entsprechenden Reaktionspuffern nach Angaben der Hersteller. Die Inkubationsdauer bei 37 °C lag zwischen 2 und 4 Stunden. Die Ansätze wurden anschließend mit dem *PCR Purification Kit* der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

2.6.5 Trennung und Isolierung von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente wurden mit 10 % (v/v) DNA-Probenpuffer gemischt und elektrophoretisch mit Hilfe von Agarosegelen (0.7-1 % (w/v) Agarose in TAE-Puffer) aufgetrennt. Als Größenvergleich diente der DNA-Marker „Gene Ruler DNA ladder mix“ (Fermentas). Zur Sichtbarmachung der DNA wurde das Gel nach der Elektrophorese für 15 – 20 Minuten in Ethidiumbromidlösung (10 µg/ml) inkubiert und unter UV-Belichtung bei 266 nm mit der Chemidoc-Anlage der Firma Biorad dokumentiert. Die Reinigung von DNA aus Agarosegelen erfolgte nach der elektrophoretischen Trennung. Die DNA Fragmente von Interesse wurden unter möglichst kurzzeitiger UV-Exposition ausgeschnitten und mit dem *Gel Extraction Kit* (Qiagen) nach Angaben des Herstellers gereinigt.

TAE-Puffer	Tris-Acetat (pH 8.5)	40 mM
	EDTA	1 mM
DNA-Probenpuffer (für Agarosegele)	Bromphenolblau	350 µM
	Xylen Cyanol FF	450 µM
	Orange G	0.25 %
	Saccharose	115 mM

2.6.6 Ligation von DNA

Die Ligation von DNA-Fragmenten erfolgte mit Hilfe der T4-DNA-Ligase (1 Unit pro 10 µl Ansatz). Zunächst wurden dazu der Vektor und die zu ligierenden DNA-Fragmente mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen geschnitten. Gegebenenfalls wurde der Vektor anschließend mit SAP (3.5 Units) 1.5 Stunden bei 37 °C dephosphoryliert. Nach 15-minütiger Inaktivierung der SAP bei 65 °C wurden die DNA-Fragmente mit dem *PCR Purification Kit* (Qiagen) aufgereinigt. Die Ligation erfolgte im Ligationspuffer (Fermentas) nach Angaben des Herstellers bei 18 °C für 12 – 24 Stunden, wobei ein Überschuss an Insert-DNA eingesetzt wurde.

2.6.7 Transformation von Bakterien

2.6.7.1 Transformation von *Escherichia coli*

Herstellung kompetenter *Escherichia coli*-Zellen:

Eine Übernachtskultur von einer Einzelkolonie *E. coli* DH10B oder SM10 wurde aerob bei 37 °C und 200 rpm geschüttelt. Von dieser wurde eine 500 ml Flüssigkultur in Superbroth mit einer OD₅₇₈ von 0.05 angesetzt und bis zu einer OD₅₇₈ von etwa 0.5 bis 0.6 bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Die Kultur wurde 15 Minuten auf Eis abgekühlt und anschließend mit 3500 g bei 4 °C für 15 Minuten zentrifugiert. Das Bakteriensediment wurde in 500 ml eiskaltem sterilen Wasser resuspendiert und wieder zentrifugiert (3500 g; 15 min; 4 °C). Die Zellen wurden noch ein weiteres Mal wie beschrieben mit eiskaltem Wasser gewaschen, danach in 20 ml 10 % igem Glycerin resuspendiert und zentrifugiert (3500 g; 15 min; 4 °C). Abschließend wurden die Zellen in 1 ml 10 %igem Glycerin gelöst. Danach wurden die Zellen entweder direkt für die Transformation eingesetzt oder in 125 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –80 °C gelagert.

Elektroporation von *Escherichia coli*:

Diese kompetenten *E. coli*-Zellen wurden durch Elektroporation (Dower *et al.*, 1998) mit Hilfe eines Gene PulsersTM (Biorad) transformiert. Dazu wurden 40 µl der *E. coli* Zellen und 0.25 – 1 µg Plasmid-DNA in eine Transformationsküvette mit 2 mm Elektrodenabstand überführt und im Gene PulserTM elektroporiert (2.5 kV, 200 Ω, 25 µF). Anschließend wurden die transformierten Zellen zur Regeneration in 1 ml LB-Medium 1 - 2 Stunden bei 37 °C und

300 rpm inkubiert. Von den Ansätzen wurden 100 bis 200 µl auf LB-Platten mit den entsprechenden Antibiotika ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Superbroth	Trypton	32 g/l
	Hefe-Extrakt	20 g/l
	NaCl	5 g/l

2.6.7.2 Transformation von *Pseudomonas aeruginosa*

Herstellung kompetenter *Pseudomonas aeruginosa*-Zellen:

P. aeruginosa wurde aus der Glycerinkultur fraktioniert auf einer LB-Agarplatte ausgestrichen und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Eine Einzelkolonie wurde dann auf einer frischen LB-Agarplatte ausgestrichen und bei 37 °C für maximal 16 Stunden inkubiert. Von dieser Platte wurde mit einer sterilen Impföse etwas Bakterienmaterial abgenommen, in 500 µl sterilem milli-Q H₂O resuspendiert und 1 Minute bei RT und 12000 g in einer Eppendorf-Tischzentrifuge zentrifugiert. Die Zellen wurden ein weiteres Mal gewaschen, bevor sie in 50 µl milli-Q H₂O resuspendiert und für die Transformation eingesetzt wurden.

Elektroporation von *Pseudomonas aeruginosa*:

50 µl dieser kompetenten *P. aeruginosa*-Zellen und die Plasmid-DNA wurden in Elektroporationsküvetten mit 1 mm Elektrodenabstand überführt und bei 1.9 kV, 200 Ω und 25 µF im Gene PulserTM (Biorad) elektroporiert. Nach der anschließenden Regenerationsphase von 1 – 2 Stunden bei 37 °C und 300 rpm wurden 100 bis 200 µl des Ansatzes auf LB-Platten mit dem entsprechenden Antibiotika ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Diparental mating zur Transformation von *Pseudomonas aeruginosa*:

E. coli SM10 enthält alle für eine Konjugation notwendigen Gene. Dadurch kann ein Vektor, der einen *origin of transfer* (*oriT*) enthält, aus *E. coli* SM10 durch eine Konjugation in *P. aeruginosa* eingebracht werden.

Dazu wurden Übernachtskulturen von *E. coli* SM10, welche den gewünschten Vektor enthielten, und von einem Empfängerstamm, z.B. *P. aeruginosa* PAO1, bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Für das *diparental mating* wurden 2 ml *E. coli* Übernachtskultur und 0.5 ml *P. aeruginosa* Übernachtskultur für je 1 Minute bei 12000 g in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Die Zellen wurden in je 50 µl LB resuspendiert, vereinigt, als Tropfen auf eine

LB-Agarplatte gegeben, 1 Stunde getrocknet und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Während dieser Zeit wird das mobilisierbare Plasmid von *E. coli* in *P. aeruginosa* übertragen. Die Bakterien wurden am nächsten Tag mit 1 ml LB von der Platte geschwemmt und resuspendiert. 100 – 400 µl der Zellsuspension wurde auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum zur Selektion von transformierten *P. aeruginosa*-Zellen (mit Plasmid) ausplattiert und bei 37 °C für 24 – 48 Stunden inkubiert. Die Platten enthielten zusätzlich 10 µg/ml Chloramphenicol, um das Wachstum des *E. coli* SM10 Donorstammes zu hemmen.

2.6.8 Präparation von Plasmid-DNA

2.6.8.1 Mini-Präparation von DNA

Zur Identifizierung positiver *E. coli* Klone nach einer Transformation wurde die Plasmid-DNA mit Hilfe der Mini-Präparation nach der alkalischen Lyse-Methode (Birnboim & Doly, 1979; Sambrook *et al.*, 1989) aus den Bakterien isoliert.

Dazu wurden 4 ml Kulturen der Klone von Interesse bei 37 °C und 200 rpm über Nacht inkubiert. Die Kulturen wurden für 2 Minuten mit 16000 g bei 4 °C zentrifugiert. Das Bakteriensediment wurde in 300 µl Puffer P1 resuspendiert. Nach Zugabe von 300 µl Puffer P2 und vorsichtigem Mischen wurde 5 Minuten bei RT inkubiert. Danach wurden 300 µl Puffer P3 zugegeben, vorsichtig gemischt und nochmals 5 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurde zentrifugiert (16000 rpm; 30 min; 4 °C), der Überstand zur Ausfällung der Plasmid-DNA anschließend mit 0.7 Volumenteilen Isopropanol gemischt, 10 Minuten bei RT inkubiert und zentrifugiert (16000 rpm; 30 min; 4 °C). Das DNA-Sediment wurde mit 70 %igem Ethanol gewaschen, an der Luft getrocknet, in 50 µl Wasser gelöst und bei –20 °C gelagert. Nach der Präparation wurden Restriktionsansätze zur Überprüfung der Klone durchgeführt.

Puffer P1	Glucose	50 mM
	Tris/HCl (pH 8.0)	25 mM
	EDTA (pH 8.0)	10 mM
Puffer P2	NaOH	200 mM
	SDS	1 % (w/v)
Puffer P3	Na-Acetat (pH 5.3)	3 M

2.6.8.2 Midi-Präparation von DNA

Plasmid-DNA wurde mit Hilfe des MIDI-Prep-Kits der Firma Qiagen (Hilden) aus *E. coli* gereinigt. Dazu wurde nach der Vorschrift des Herstellers verfahren.

2.6.9 Microarray-Experimente

Alle in dieser Arbeit beschriebenen Microarray-Experimente wurden in Zusammenarbeit mit Katharina Trunk durchgeführt. Für eine Isolation der zellulären RNA wurden verwendete Stämme in AB-Minimalmedium, welches 50 mM Nitrat und 50 mM Glucose enthielt, inokuliert und aerob bei 200 rpm und 37 °C kultiviert. Bei Erreichen einer OD₅₇₈ von 0.3 wurden diese Bakteriensuspensionen sofort in Anaerob-Flaschen überführt und für weitere 2 Stunden unter anaeroben Bedingungen inkubiert. Danach wurden die Zellen geerntet und die Gesamt-RNA nach der in Aiba *et al.* (1981) beschriebenen modifizierten *hot phenol*-Methode extrahiert. Die Herstellung der cDNA, das Labeling und die Hybridisierung des Affymetrix *GeneChips* wurde nach dem Protokoll des Herstellers (Affymetrix, Santa Clara) durchgeführt. Die Daten wurden mit Hilfe der Software Affymetrix Microarray Suite 5.0 von Dr. Max Schobert und Katharina Trunk ausgewertet.

A-10	(NH ₄) ₂ SO ₄	20 g	trace metals	CaSO ₄ ·2H ₂ O	200 mg
	Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	60 g		FeSO ₄ ·7H ₂ O	200 mg
	KH ₂ PO ₄	30 g		MnSO ₄ ·H ₂ O	20 mg
	NaCl	30 g		CuSO ₄ ·5H ₂ O	20 mg
	milliQ-H ₂ O	1000 ml		ZnSO ₄ ·7H ₂ O	20 mg
BtraceNitrate	1 M MgCl ₂	1 ml		CoSO ₄ ·7H ₂ O	10 mg
	1 M CaCl ₂	0.1 ml		NaMoO ₄ ·H ₂ O	10 mg
	trace metals	1 ml		H ₃ BO ₃	5 mg
	KNO ₃	5 g		milliQ-H ₂ O	200 ml
	ad milliQ-H ₂ O	900 ml			
AB-Medium	A-10	100 ml			
	BtraceNitrat	900 ml			
	2 M Glucose	25 ml			

2.7 Klonierungsstrategien

2.7.1 Konstruktion einer *lacZ*-Reportergenfusion des *ackA*-Promotors

Zur Analyse eines Promotors wurde eine Reportergenfusion mit dem Gen der β -Galaktosidase aus *E. coli* und dem gewünschten putativen Promotorbereich hergestellt. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass der β -Galaktosidase-Assay ein einfacher, schneller und reproduzierbarer Enzymtest ist, mit dem sehr gut verschiedenste Einflüsse auf die Promotoraktivität analysiert werden können.

Zur Untersuchung der Regulation des *ackA-pta*-Locus wurde mit den Primern PAO-Prom-ackA-for (5'-GCATGGTTCGAGATCTTTTTCGATAAAGAAG-3', *Bgl*II) und PAO-Prom-ackA-rev (5'-GCATCACGGATCCTTGGTCTGCTC-3', *Bam*HI) ein 314 bp langes PCR-Fragment des stromaufwärts von *ackA* gelegenen Bereiches aus genomischer DNA von *P. aeruginosa* amplifiziert (310 bp stromaufwärts des *ackA*-Startkodons bis Position +4). Das Fragment wurde dann über die eingebrachten Schnittstellen in die MCS des *lacZ*-Reportergenvektors pQF50 kloniert, um das Plasmid packA zu erhalten.

2.7.2 Konstruktion von *Pseudomonas aeruginosa* Knockout-Mutanten

Für die Herstellung der chromosomalen Knockout-Mutanten von *P. aeruginosa* wurde ausschließlich nach der Methode von Hoang *et al.* (1998) verfahren und der ‚gene replacement‘-Vektor pEX18Ap verwendet. Dabei wurden in die MCS dieses Vektors jeweils die flankierenden Bereiche des auszuschaltenden Genes und dazwischen die Gentamycin-Resistenzkassette aus dem Plasmid pPS858 hineinkloniert. Die konstruierten Vektoren wurden durch *diparental mating* vom *E. coli*-Stamm SM10 in den *P. aeruginosa* Wildtyp PAO1 überführt (siehe 2.6.7.2).

Das Plasmid pEX18Ap enthält das *sacB*-Gen, dessen kodierte Protein aus Sucrose ein für die Zelle toxisches Produkt bildet, sofern 5 % Sucrose zum Medium gegeben wird. Dadurch können nur diejenigen Zellen wachsen und auf Agarplatten Kolonien bilden, welche die Plasmid-DNA wieder verloren haben.

2.7.2.1 Konstruktion der chromosomalen *pta*-Mutante PAO-ME1

Durch homologe Doppelrekombination mit dem Plasmid pMEP2 wurde aus dem chromosomalen *pta*-Gen eine 288 bp lange Sequenz deletiert und durch eine Gentamycin-Resistenzkassette ersetzt (Schematische Darstellung: siehe Abb. 14 in Kap. 3.3.4.1.1).

Für die Konstruktion des *suicide*-Vektors pMEP2 wurde zuerst ein PCR-Fragment, welches eine 348 bp lange Sequenz stromabwärts des Gens *pta* sowie 1801 bp von *pta* selbst enthält, mit *Bam*HI und *Hind*III geschnitten und in den mit den gleichen Enzymen verdauten pEX18Ap Vektor ligiert. Das dabei resultierende Plasmid pMEP1 wurde danach mit *Sal*I geschnitten, wodurch ein 288 bp langes Fragment an den beiden natürlich vorhandenen *Sal*I-Schnittstellen (1482 bp und 1770 bp stromabwärts des *pta*-Startkodons) aus dem *pta*-Gen deletiert wurde. Zuletzt wurde der lineare Vektor mit einer Gm-Kassette ligiert, welche durch Schneiden von pPS858 mit *Sal*I und Reinigung aus einem Agarosegel erhalten worden war. Das fertige Konstrukt pMEP2 wurde schließlich mittels Elektroporation in *E. coli* SM10 hinein transformiert (siehe 2.6.7.1) und von dort durch bakterielle Konjugation (*diparental mating*, siehe 2.6.7.2) in *P. aeruginosa* hinein geschleust.

Der *suicide*-Vektor pMEP2 ist in *P. aeruginosa* nicht frei replizierbar und so überleben unter Antibiotikaselektion nur diejenigen Zellen, die die Resistenzkassette korrekt ins Chromosom integrieren konnten. Das mehrmalige Ausplattieren auf LB-Agarplatten mit 200 µg/ml Gentamycin und 5 % Sucrose lieferte deshalb einige Kolonien, von denen 12 mittels Kolonie-PCR erfolgreich auf korrekte Doppelrekombination getestet wurden. Bei dieser PCR bindet der eine Primer stromaufwärts und der andere stromabwärts der Integrationsstelle der Gentamycin-Kassette. Anhand der Länge der erhaltenen DNA-Fragmente kann das *pta*-Gen (Wildtyp) vom *pta*-Gen mit dem deletierten 288 bp Fragment sowie vom fertigen *pta*-Knockout-Konstrukt (*pta* minus 288 bp plus insertierter Gentamycin-Kassette) unterschieden werden.

Die Primer Pa-pta-cuta-for und Pa-pta-cutb-rev, mit denen das PCR-Fragment amplifiziert wurde, sowie die Primer Pa-ptaint-for und Pa-ptaint-rev, mit denen die Kolonien auf die korrekte chromosomale Doppelrekombination getestet wurden, sind in Tab. 2 dargestellt.

Tab. 2 Primer zur Amplifikation des *pta*-Bereiches für die Konstruktion eines Vektors zur *pta*-Inaktivierung, sowie Primer zur Verifizierung der *pta*-Mutanten (PAO-ME1).

Fehlpaarende Basen (*mismatches*) sind dabei mit kleinen Buchstaben gekennzeichnet und Schnittstellen für Restriktionsenzyme sind unterstrichen.

Bezeichnung	verwendete Primer	Schnittstelle
Pa-pta-cuta-for	5'-CGTCGAAGGCATGGatCCGACCCGTC-3'	<i>Bam</i> HI
Pa-pta-cutb-rev	5'-GGGTGCGCTGGACaAGcTTCATCCAGC-3'	<i>Hind</i> III
Pa-ptaint-for	5'-GCGACCATGATGCTTGCCCTG-3'	
Pa-ptaint-rev	5'-GCATCATACTGCAAGGGTCCGTC-3'	

2.7.2.2 Konstruktion der chromosomalen *ldhA*-Mutante PAO-ME3

Durch homologe Doppelrekombination mit dem Plasmid pMEP11 wurde aus dem chromosomalen *ldhA*-Gen eine 726 bp lange Sequenz deletiert und durch eine Gentamycin-Resistenzkassette ersetzt (Schematische Darstellung: siehe Abb. 15 in Kap. 3.3.4.1.2).

Zur Konstruktion des *suicide*-Vektors pMEP11 wurde zuerst ein PCR-Fragment, welches das komplette *ldhA*-Gen (987 bp lang) sowie eine 558 bp lange stromaufwärts gelegene Sequenz und eine 346 bp lange stromabwärts gelegene Sequenz enthält, mit *Bam*HI und *Hind*III geschnitten und in den mit den gleichen Enzymen verdauten pEX18Ap Vektor ligiert. Das dabei resultierende Plasmid pMEP5 wurde danach mit *Sda*I geschnitten (8er-Cutter), wodurch ein 726 bp langes Fragment an den beiden natürlich vorhandenen *Sda*I-Schnittstellen (102 bp und 828 bp stromabwärts des *ldhA*-Startkodons) aus dem *ldhA*-Gen deletiert wurde. Zuletzt wurde der lineare Vektor mit einer Gm-Kassette ligiert, welche durch Schneiden von pPS858 mit *Pst*I und Reinigung aus einem Agarosegel gewonnen worden war. Das fertige Konstrukt pMEP11 wurde schließlich mittels Elektroporation in *E. coli* SM10 hineintransformiert (siehe 2.6.7.1) und von dort durch bakterielle Konjugation (*diparental mating*, siehe 2.6.7.2) in *P. aeruginosa* hinein geschleust.

Der *suicide*-Vektor pMEP11 ist in *P. aeruginosa* nicht frei replizierbar und so überleben unter Antibiotikaselektion nur diejenigen Zellen, die die Resistenzkassette korrekt ins Chromosom integrieren konnten. Das mehrmalige Ausplattieren auf LB-Agarplatten mit 200 µg/ml Gentamycin und 5 % Sucrose lieferte deshalb einige Kolonien, von denen allerdings nur eine mittels Kolonie-PCR zweifelsfrei als korrekte *ldhA*-Mutante identifiziert werden konnte. Bei dieser PCR bindet der eine Primer stromaufwärts und der andere stromabwärts der Integrationsstelle der Gentamycin-Kassette. Anhand der Länge der erhaltenen DNA-Fragmente kann das *ldhA*-Gen (Wildtyp) vom *ldhA*-Gen mit dem deletierten 726 bp Fragment sowie vom fertigen *ldhA*-Knockout-Konstrukt (*ldhA* minus 726 bp plus insertierter Gentamycin-Kassette) unterschieden werden.

Die Primer Pa-ldhA-cuta-for und Pa-ldhA-cutb-rev, mit denen das PCR-Fragment amplifiziert wurde, sowie die Primer Pa-ldhAint-for und Pa-ldhAint-rev, mit denen die Kolonien auf die korrekte chromosomale Doppelrekombination getestet wurden, sind in Tab. 3 dargestellt.

Tab. 3 Primer zur Amplifikation des *ldhA*-Bereiches für die Konstruktion eines Vektors zur *ldhA*-Inaktivierung, sowie Primer zur Verifizierung der *ldhA*-Mutanten (PAO-ME3).

Fehlpaarende Basen (*mismatches*) sind dabei mit kleinen Buchstaben gekennzeichnet und Schnittstellen für Restriktionsenzyme sind unterstrichen.

Bezeichnung	verwendete Primer	Schnittstelle
Pa-ldhA-cuta-for	5'-GGTGCCGGgGATCcCGCTCAC-3'	<i>Bam</i> HI
Pa-ldhA-cutb-rev	5'-CGAAGTCGAGACaAGCtTGGCACTGGT-3'	<i>Hind</i> III
Pa-ldhAint-for	5'-GGCACGGCTTCGAACCTGCAC-3'	
Pa-ptaint-rev	5'-CGTTGGGGAAGCTCAGCAGG-3'	

2.7.2.3 Konstruktion der chromosomalen *hemA*-Mutante PAO-ME2

Durch homologe Doppelrekombination mit dem Plasmid pMEP4 wurde aus dem chromosomalen *hemA*-Gen eine 69 bp lange Sequenz deletiert und durch eine Gentamycin-Resistenzkassette ersetzt (Schematische Darstellung: siehe Abb. 25 in Kap. 3.3.11.1).

Zur Konstruktion des *suicide*-Vektors pMEP4 wurde zuerst ein PCR-Fragment, welches 1025 bp des *hemA*-Gens enthält, mit *Bam*HI und *Sph*I geschnitten und in den mit den gleichen Enzymen verdauten pEX18Ap Vektor ligiert. Das dabei resultierende Plasmid pMEP3 wurde danach mit *Sal*I geschnitten, wodurch ein 69 bp langes Fragment an den beiden natürlich vorhandenen *Sal*I-Schnittstellen (825 bp und 894 bp stromabwärts des *hemA*-Startkodons) aus dem *hemA*-Gen deletiert wurde. Zuletzt wurde der lineare Vektor mit einer Gm-Kassette ligiert, welche durch Schneiden von pPS858 mit *Sal*I und Reinigung aus einem Agarosegel gewonnen worden war. Das fertige Konstrukt pMEP4 wurde schließlich mittels Elektroporation in *E. coli* SM10 hineintransformiert (siehe 2.6.7.1) und von dort durch bakterielle Konjugation (*diparental mating*, siehe 2.6.7.2) in *P. aeruginosa* hinein geschleust.

Der *suicide*-Vektor pMEP4 ist in *P. aeruginosa* nicht frei replizierbar und so überleben unter Antibiotikaselektion nur diejenigen Zellen, die die Resistenzkassette korrekt ins Chromosom integrieren konnten. Das mehrmalige Ausplattieren auf LB-Agarplatten mit 200 µg/ml Gentamycin, 5 % Sucrose und 100 µg/ml 5-Aminolävulinsäure lieferte deshalb einige Kolonien, von denen zehn mittels Kolonie-PCR erfolgreich auf korrekte Doppelrekombination getestet wurden. Bei dieser PCR bindet der eine Primer stromaufwärts und der andere stromabwärts der Integrationsstelle der Gentamycin-Kassette. Anhand der Länge der erhaltenen DNA-Fragmente kann das *hemA*-Gen (Wildtyp) vom *hemA*-Gen mit

dem deletierten 68 bp Fragment sowie vom fertigen *hemA*-Knockout-Konstrukt (*hemA* minus 68 bp plus insertierter Gentamycin-Kassette) unterschieden werden.

Die Primer Pa-hemA-for und Pa-hemA-rev, mit denen das PCR-Fragment amplifiziert wurde, sowie die Primer Pa-hemAint-for und Pa-hemAint-rev, mit denen die Kolonien auf die korrekte chromosomale Doppelrekombination getestet wurden, sind in Tab. 4 dargestellt.

Tab. 4 Primer zur Amplifikation des *hemA*-Bereiches für die Konstruktion eines Vektors zur *hemA*-Inaktivierung, sowie Primer zur Verifizierung der *hemA*-Mutanten (PAO-ME2).

Fehlpaarende Basen (*mismatches*) sind dabei mit kleinen Buchstaben gekennzeichnet und Schnittstellen für Restriktionsenzyme sind unterstrichen.

Bezeichnung	verwendete Primer	Schnittstelle
Pa-hemA-for	5'-CCTGCAACCGGA <u>tCc</u> AACTCTACCTGG-3'	<i>Bam</i> HI
Pa-hemA-rev	5'-GGGCGC <u>aTGC</u> AGCAGTTTGTGG-3'	<i>Sph</i> I
Pa-hemAint-for	5'-GCTGAAGCAGCGCAAGCACAAG-3'	
Pa-hemAint-rev	5'-GGCTCTTGAGATTCTCCGCCAC-3'	

2.8 Proteomics-Analyse: Zwei-dimensionale Elektrophorese mit immobilisierten pH-Gradienten

O'Farrell veröffentlichte 1975 das Prinzip der zwei-dimensionalen Polyacrylamidgelelektrophorese (2 D-PAGE) zur Trennung von Proteinen nach den beiden physikalischen Größen Ladung und Molekulargewicht. Dadurch wird die Untersuchung von mehreren hundert Proteinen auf einem Gel ermöglicht. Görg und Mitarbeiter verbesserten das Auflösungsvermögen und die Reproduzierbarkeit der 2-D Technik durch Verwendung eines immobilisierten pH-Gradienten bei der isoelektrischen Fokussierung (Görg et al., 1985).

2.8.1 Zellernte

P. aeruginosa wurde wie unter 2.5.3 beschrieben im entsprechenden Medium kultiviert. Das Wachstum der Zellen wurde zum Zielzeitpunkt möglichst schnell zum Stillstand gebracht, indem das aus dem Kulturgefäß oder Reaktor entnommene Medium sofort mit dem gleichen Volumen an eisgekühltem Kalium-Phosphat-Puffer (100 mM; pH 7.4) versetzt und 20 Minuten auf Eis inkubiert wurde. Alle nachfolgenden Schritte wurden zügig bei 4 °C durchgeführt, um Veränderungen der Proteinzusammensetzung während der Präparation zu vermeiden. Die gekühlten Zellen wurden bei 8000 g und 4 °C für 15 Minuten abzentrifugiert, die Zellsedimente mit 50 ml Kalium-Phosphat-Puffer gewaschen und nach erneuter Zentrifugation bei 8000 g in 3 - 5 ml Kalium-Phosphat-Puffer resuspendiert. Die Zellsuspensionen wurden in Portionen zu 1 ml bei -80 °C gelagert. Von diesen wurden je 60 µl für die spätere BCA-Proteinbestimmung (2.8.3.1) entnommen und ebenfalls bei -80 °C gelagert. Die Proteine wurden bei Bedarf jeweils aus den 940 µl Aliquots extrahiert, wie unter 2.8.2 beschrieben.

2.8.2 Phenolextraktion und Acetonfällung der Proteine

Die Zellen wurden durch Zugabe von Phenol (pH 7.4) und anschließendem Erhitzen auf 70 °C aufgeschlossen. Dabei wurden jeweils die wässrigen Phasen verworfen, um Salze, Nukleinsäuren, Polysaccharide und andere hydrophile Zellbestandteile zu entfernen. Bei dieser Methode lösen sich einige hydrophobe Proteine in der organischen Phenol-Phase, während sich die anderen nach der Zentrifugation denaturiert in der Interphase ansammeln (Hanna *et al.*, 2000, Hancock & Nikaid, 1978). Abschließend werden die Proteine mit Aceton gefällt und der Proteinextrakt getrocknet.

Eine bei -80 °C gelagerte Zellsuspension (940 µl) wurde mit 1 ml Kalium-Phosphat-Puffer und 2 ml Phenol (pH 7.4) versetzt und für 2 Minuten stark geschüttelt. Der Zellaufschluss erfolgte durch 10-minütige Inkubation bei 70 °C im Wasserbad. Danach wurden die Zellen weitere 10 Minuten bei 0 °C auf Eis inkubiert. Die Phasentrennung erfolgte durch Zentrifugation bei 4000 g und 4 °C für 20 Minuten. Nachdem die obere wässrige Phase verworfen worden ist, wurden 2 ml destilliertes Wasser zum Waschen hinzugegeben und die vorherigen Schritte wiederholt (starkes Schütteln, 10 Minuten bei 70 °C, 10 Minuten bei 0 °C, Zentrifugation, Verwerfen der wässrigen Phase). Danach wurden die Proteine durch Zugabe von 4 ml kaltem Aceton und 10-minütiger Inkubation auf Eis vollständig gefällt. Nach der Zentrifugation (4000 g; 15 min; 4 °C) wurde der Überstand (Phenol/Aceton-Gemisch) verworfen und der Proteinextrakt mit weiteren 6 ml Aceton gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand wieder verworfen und der an Luft getrocknete Proteinextrakt bei -80 °C gelagert.

2.8.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

2.8.3.1 Der BCA-Test

Um die Proteinkonzentration eines zellfreien Bakterienextrakts mit Hilfe des BCA-Test zu bestimmen, wurden die Zellen alkalisch aufgeschlossen. Dabei wurden 60 µl der Bakteriensuspension mit 300 µl destilliertem Wasser verdünnt und danach mit 150 µl 2 N Natriumhydroxid-Lösung versetzt. Die Suspension wurde 1 Stunde bei 70 °C im Thermoschüttler inkubiert. Von diesem Zelllysate wurden 50 µl für den BCA-Test eingesetzt. Die Lösungen des BCA-Tests wurden kurz vor Gebrauch so angesetzt, wie in der Anleitung des Herstellers Sigma (Deisenhofen) beschrieben.

50 µl der Probe wurden mit 1 ml Nachweislösung versetzt und 30 Minuten bei 60 °C inkubiert. Nach Abkühlung des Gemischs auf Raumtemperatur wurden die Extinktionen bei 562 nm gemessen. Die Proteinkonzentration konnte durch Vergleich mit einer Eichgeraden, bei der BSA als Standard eingesetzt worden war, ermittelt werden.

2.8.3.2 Klassische SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

Die klassische SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli (1970) wurde verwendet, um die Qualität und gleichzeitig die ungefähre Menge der hergestellten Proteinextrakte in Vorversuchen zu analysieren. Die Auftrennung der komplexen

Proteingemische nach relativen denaturierten Molekularmassen der enthaltenen Proteine erfolgte in Mini Protean II-Apparaturen (Biorad) bei 50 mA. Die Gele wurden ungefähr zwei Stunden gefärbt und anschließend so lange im Entfärber geschwenkt, bis die gefärbten Proteine deutlich zu sehen waren. Zur Aufbewahrung wurden die Gele zwischen zwei Cellophan-Schichten getrocknet.

Relative molekulare Massen der verwendeten Markerproteine Dalton Marker VII-L™:

Serumalbumin (aus Rind)	66 000
Ovalbumin (aus Hühnereiweiß)	45 000
GAPDH	36 000
Carboanhydrase	29 000
Trypsinogen (aus Rinderpankreas)	24 000
Trypsin-Inhibitor (aus Sojabohne)	20 000
α -Lactalbumin (aus Rindermilch)	12 000

Acrylamid-Stammlösung	Acrylamid	39 % (w/v)
	N, N'-Methylenbisacrylamid	1 % (w/v)
Sammelgel (3 %ig, w/v)	Acrylamid-Stammlösung	1.5 ml
	Tris/HCl (pH 6.8)	500 mM
	0.4 % SDS (w/v)	2.5 ml
	dH ₂ O	6 ml
	TEMED	10 μ l
	APS (10 %, w/v)	100 μ l
Trenngel (12 %ig, w/v)	Acrylamid-Stammlösung	6 ml
	Tris/HCl (pH 8.8)	1.5 M
	0.4 % SDS (w/v)	5 ml
	dH ₂ O	9 ml
	TEMED	20 μ l
	APS (10 %, w/v)	200 μ l
Elektrodenpuffer	Glycin	380 mM
	Tris/HCl (pH 8.3)	50 mM
	SDS	0.1 % (w/v)
SDS-Probenpuffer	Tris/HCl (pH 6.8)	100 mM
	Glycerin	40 % (v/v)
	β -Mercaptoethanol	10 % (v/v)
	SDS	3.2 % (w/v)
	Bromphenolblau	0.2 % (w/v)

Färbelösung	Essigsäure	10 % (v/v)
	Ethanol	25 % (v/v)
	Coomassie Brilliant Blue G-250	0.25 % (w/v)
Entfärbelösung	Essigsäure	10 % (v/v)
	Ethanol	30 % (v/v)

2.8.4 Isoelektrische Fokussierung im immobilisierten pH-Gradienten

Zur Analyse der Proteinexpressionsmuster von *P. aeruginosa* unter verschiedenen Bedingungen wurde die Methode der zwei-dimensionalen Gelelektrophorese eingesetzt (O'Farrell, 1975). Für die erste Dimension, der isoelektrischen Fokussierung (IEF), wurden Polyacrylamidgele mit immobilisierten pH-Gradienten (IPG-Streifen) der Firmen Biorad und Amersham Pharmacia verwendet. Die gebrauchsfertigen Gel-Streifen werden unter der Bezeichnung „Ready Strip“ (Bio-Rad) und „Immobiline DryStrip“ (Amersham Pharmacia) mit verschiedenen pH-Gradienten angeboten.

Bevor der getrocknete Proteinextrakt für die IEF eingesetzt werden kann, muss dieser rehydratisiert werden. Da die Proteine nach ihrer elektrischen Ladung getrennt werden sollen, können zur Solubilisierung keine ionischen Tenside (wie z.B. SDS) verwendet werden. Die Rehydratisierungslösung enthält deshalb folgende Komponenten, um die Proteine dennoch möglichst vollständig zu lösen und zu denaturieren:

Das zwitterionische Detergenz 3-[(3Cholamidopropyl)-dimethyl-amino]-Propansulfat (CHAPS) verhindert hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den hydrophoben Bereichen der Proteine. Die Nettoladung der Proteine wird dabei im Gegensatz zur Verwendung von SDS nicht verändert. Triton X-100TM ist ein ungeladenes Detergenz und besitzt eine ähnliche Funktion wie CHAPS. Das Reagenz Dithiothreitol (DTT) reduziert die kovalenten Disulfid-Brücken der Proteine zu Thiolgruppen. Darüber hinaus entziehen Harnstoff und Thioharnstoff den Proteinen die Hydrathülle. Hierdurch werden die Proteine in Kombination mit den Tensiden und DTT denaturiert.

Rehydratisierungslösung-a	Harnstoff	7 M
	Thioharnstoff	2 M
	CHAPS	4 % (w/v)
	DTT	50 mM

Rehydratisierungslösung-b	Rehydratisierungslösung-a	2.5 ml
	Ampholytlösung	125 µl
	TritonX-100	125 µl
	Bromphenolblau	0.02 % (w/v)

2.8.4.1 Rehydratisierung der Proteine

Die getrockneten Proteinextrakte wurden in 300 µl Rehydratisierungslösung-a resuspendiert. Das nach der 2-minütigen Zentrifugation mit 4000 g entstandene Sediment wurde durch Schütteln resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden 225 µl des Überstandes in ein neues Gefäß überführt. Die Proteinkonzentration wurde mit Rehydratisierungslösung-a je nach Bedarf auf 2.5 – 5 mg/ml eingestellt. Von dieser Lösung wurden 200 µl mit 100 µl Rehydratisierungslösung-b gemischt und in den Rehydratisierungs-Tray (Amersham Pharmacia) pipettiert. Die getrockneten IPG-Streifen des jeweiligen pH-Bereiches wurden vor der eigentlichen Fokussierung direkt mit der Proteinprobe rehydratisiert. Dazu wurden sie luftblasenfrei mit der Gelseite nach unten vorsichtig in den mit Proteinproben beladenen Rehydratisierungs-Tray hineingelegt. Die IPG-Streifen wurden mit Mineralöl überschichtet, um sie vor Austrocknung bzw. der Auskristallisierung des Harnstoffs zu schützen, und für mindestens 12 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

2.8.4.2 Elektrophorese der 1. Dimension

Nach der Rehydratisierung der IEF-Streifen in der Proteinlösung erfolgte die Fokussierung im IEF-Tray (PROTEAN IEF-Cell, Biorad). Dazu wurden die IEF-Streifen aus dem Rehydratisierungs-Tray herausgenommen und das überschüssige Mineralöl vorsichtig entfernt. Nachdem die in milliQ-Wasser getränkten Filter auf die Elektroden gelegt worden waren, wurden die IEF-Streifen mit der Gelseite nach unten in den IEF-Tray gelegt. Es wurde das in Tab. 5 dargestellte Zeitprogramm für die anliegende Spannung verwendet, wobei die Stromstärke auf 50 µA / Streifen begrenzt wurde.

Nach mindestens 110 kVh war die isoelektrische Fokussierung beendet und die Gelstreifen wurden bis zur 2. Dimension in Klarsichthüllen bei -80 °C eingefroren oder gleich für die 2. Dimension vorbereitet.

Tab. 5: IEF-Spannungs-Programm

Schritt	Dauer (h)	Spannung (V)
1	1	250
2	1	500
3	1	1000
4	22	5000
5	∞	500

2.8.4.3 Äquilibration der IPG-Streifen

Die fertig fokussierten IPG-Gele mußten zunächst für die 2. Dimension vorbereitet werden. Dazu wurden die IPG-Streifen jeweils mit 5 ml SDS-Äquilibrationpuffer, der 15 mM DTT enthielt, überschichtet und für 15 Minuten leicht schüttelnd inkubiert. Im nächsten Schritt wurden die Streifen für 15 Minuten in jeweils 5 ml SDS-Äquilibrationpuffer mit 150 mM Iodacetamid gelegt.

SDS-Äquilibrationpuffer	Tris-HCl (pH 8.8)	50 mM
	Harnstoff	6 M
	SDS	2 % (w/v)
	Glycerin	35 % (w/v)
	Bromphenolblau	0.01 % (w/v)

2.8.5 SDS-PAGE

(Sodium dodecylsulfate - Polyacrylamide gelelectrophoresis)

In der zweiten Dimension der 2-D Gelelektrophorese werden die Proteine durch erneute Elektrophorese nach ihrer molekularen Masse getrennt. Durch Zugabe des anionischen Detergenz SDS werden die Eigenladungen der Proteine durch die negativ geladenen SDS-Ionen überlagert. SDS bindet mit seinem aliphatischen Rest an die hydrophoben Seitenketten der Aminosäuren und denaturiert die Proteine. Die Denaturierung der Proteine wird zusätzlich durch DTT unterstützt. Damit die reduzierten Disulfidbrücken während der Elektrophorese nicht erneut durch Oxidation eine kovalente Bindung eingehen, werden diese durch Alkylierung mit Iodacetamid maskiert.

2.8.5.1 Herstellung der SDS-Polyacrylamid-Gele

Das homogen vernetzte SDS-Gel wurde mit dem Puffersystem nach Laemmli (Laemmli, 1970) ohne Sammelgel hergestellt und die 2. Dimension über einen Zeitraum von 6-16 Stunden durchgeführt. Der Vernetzungsgrad betrug je nach Bedarf 10 % oder 12 % Polyacrylamid.

Die bei 4 °C hergestellten Lösungen für 10 %ige oder 12 %ige Polyacrylamid-Gele (siehe unten) wurden durchmischt und kurz vor dem Gießvorgang die Katalysatoren APS und TEMED dazugegeben. Der Polymerisationsvorgang dauerte ungefähr 2 Stunden. Die Gele wurden bis zum Gebrauch bei 4 °C zwischen den Glasplatten gelagert.

Acrylamid-Stammlösung	Acrylamid	29 % (w/v)
	N,N'-Methylenbisacrylamid	1 % (w/v)
Polyacrylamid-Gele (10 %)	Acrylamid-Stammlösung	333 ml
	1.5 M Tris-HCl (pH 8.8)	250 ml
	milliQ-H ₂ O	402 ml
	APS (10 %, w/v)	5.6 ml
	TEMED	1.1 ml
Polyacrylamid-Gele (12 %)	Acrylamid-Stammlösung	417 ml
	1.5 M Tris-HCl (pH 8.8)	250 ml
	milliQ-H ₂ O	318 ml
	APS (10 %, w/v)	5.6 ml
	TEMED	1.1 ml

2.8.5.2 Elektrophorese der 2. Dimension

Die fokussierten und äquilibrierten IPG-Streifen wurden mit einer Pinzette seitlich auf die Oberkanten der SDS-Gele gelegt und mit Sealing-Solution (enthält Agarose) fixiert. Nach dem Erstarren der Agarose wurden die SDS-Gele in die Elektrophoreseapparatur (Ettan-DALT, Amersham Pharmacia) eingesetzt. Die Elektrophorese wurde bei 25 °C und einer Spannung von 80 V durchgeführt. Nachdem der Farbmaler (Bromphenolblau) die untere Kante des Gels erreicht hatte, wurde die Elektrophorese beendet.

Als molekularer Massenstandard fand der SDS-Standard (Biorad) mit folgenden Eichproteinen Verwendung: Phosphorylase B (94 000), Rinderserumalbumin (67 000), Ovalbumin (43 000), Carboanhydrase (30 000), Trypsininhibitor (20 100) und α -Lactalbumin (14 400).

SDS-Elektrophoresepuffer	Glycin	380 mM
	Tris	50 mM
	SDS	0.1 % (w/v)
Sealing Solution	SDS-Elektrophoresepuffer	25 ml
	Agarose	2 % (w/v)
	Bromphenolblau	0.01 % (w/v)

2.8.6 Synthese des Fluoreszenzfarbstoffes RuBPS

Der zur Proteinfärbung eingesetzte Fluoreszenzfarbstoff Ruthenium-II-bathophenanthrolin-disulfonat (RuBPS, siehe Abb. 9) wurde nach der Vorschrift von Rabilloud *et al.* (2001) mit leichten Modifikationen synthetisiert.

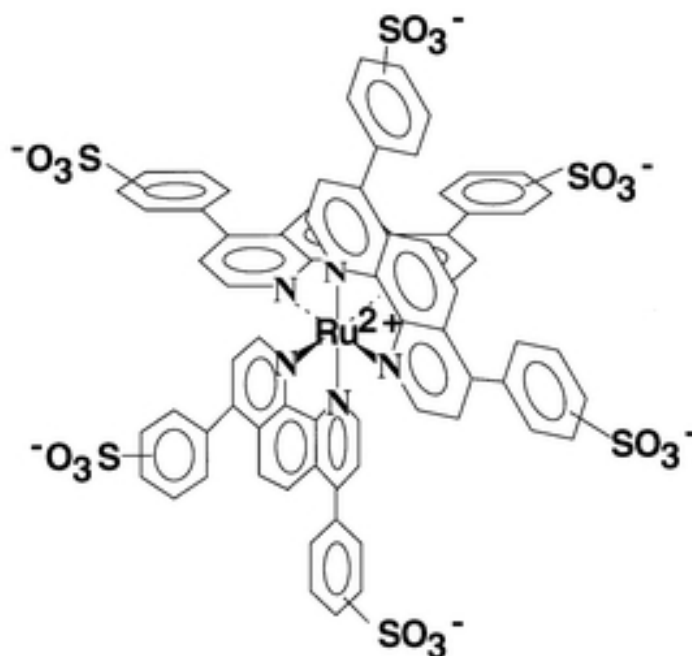


Abb. 9 Struktur von Ruthenium-II-bathophenanthrolin-disulfonat (aus Rabilloud *et al.*, 2000).

100 mg $\text{K}_2\text{Cl}_5\text{Ru}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (Alfa Aesar, Karlsruhe) wurden in 10 ml milliQ- H_2O unter Rückfluss zum Sieden erhitzt. Die kochende Salzlösung wurde mit 500 mg (entsprechen 3 molare Äquivalente) Dinatrium-Bathophenanthrolin-disulfonat-trihydrat (Fluka, Neu-Ulm) versetzt und 20 Minuten leicht siedend unter Rückfluss weiter erhitzt. Nach Zugabe von 2.5 ml einer frisch zubereiteten 500 mM Natrium-Ascorbat-Lösung zur Reduktion des Ruthenium-Zentralatoms wurde die Lösung nochmals 20 Minuten erhitzt. Der pH-Wert der fertigen Farbstofflösung wurde nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur mit verdünnter Natriumhydroxid-Lösung auf 7.0 eingestellt. Zuletzt wurde mit milliQ- H_2O auf ein

Endvolumen von 13 ml aufgefüllt, was ein Farbstoffkonzentrat mit einer ungefähren Konzentration von 20 mM ergab.

Diese wässrige RuBPS-Lösung war für mehrere Wochen bei 4 °C stabil, wie in Rabilloud *et al.* (2001) beschrieben. Für eine längere Lagerung des Fluoreszenzfarbstoffes wurde das RuBPS-Konzentrat direkt nach der Synthese in 100 µl Aliquots aufgeteilt und unter Vakuum bis zum Erhalt eines rotbraunen Feststoffes eingetrocknet. Dieses kristalline RuBPS wurde bis zum Gebrauch bei -20 °C gelagert.

2.8.7 Fixierung und Färbung der 2-D Gele

2.8.7.1 Fluoreszenzfärbung mit RuBPS

Die Proteine wurden mit Ruthenium-II-bathophenanthrolin-disulfonat (RuBPS) angefärbt. Die detektierbare Sensitivität dieses Fluoreszenz-Farbstoffes liegt bei etwa 5-10 ng Protein und ist somit höher als eine Proteinfärbung mit Coomassie Brilliant Blue. RuBPS erreicht zwar nicht ganz die Empfindlichkeit einer Färbung mit Silbernitrat, aber Fluoreszenzfärbungen sind über einen viel größeren Bereich linear (ungefähr vier Zehnerpotenzen). Die nicht-kovalent an die Proteine gebundenen Ruthenium-Chelate können sowohl unter UV-Strahlung (Absorptionsmaximum bei 280 nm) als auch mit sichtbarem Licht (Absorptionsmaximum bei 450 nm) zur Fluoreszenz angeregt werden. Ein weiterer Vorteil dieser Färbemethode ist, dass eine nachfolgende massenspektroskopische Untersuchung (MALDI) der Proteine nicht beeinträchtigt wird (Rabilloud *et al.*, 2001).

Das Färbeprotokoll wurde von Rabilloud *et al.* (2001) mit leichten Modifikationen übernommen: Zuerst wurden die Proteine bis zu 16 Stunden im Gel fixiert, wobei die Fixierlösung (30 % Ethanol, 10 % Essigsäure) nach den ersten 2 Stunden einmal ausgetauscht wurde. Zur Färbung mit RuBPS wurden die Gele anschließend für mindestens 6 Stunden in RuBPS-Färbelösung inkubiert. Vor dem Scannen im Laser-Scanner (Molecular Imager FX der Firma Bio-Rad) wurden die Gele 10 Minuten in destilliertem Wasser gewaschen.

Fixierlösung	Ethanol	30 % (v/v)
	Essigsäure	10 % (v/v)
RuBPS-Färbelösung	Ruthenium-Chelat	0.8 µM
	Ethanol	30 % (v/v)
	Essigsäure	10 % (v/v)

2.8.7.2 Färbung mit kolloidalem Coomassie Brilliant Blau

Die Färbung von Proteingelen mit kolloidalem Coomassie Brilliant Blue G-250 ist gegenüber der klassischen Coomassie-Färbemethode sensitiver, besser quantifizierbar und weist eine reduzierte Hintergrundfärbung auf (Neuhoff *et al.*, 1988).

Die Gele wurden mit 30 % Ethanol und 2 % Phosphorsäure fixiert. Die Fixierung entfiel hier, falls die Gele zuvor mit der RuBPS (siehe 2.8.7.1) angefärbt worden waren. Danach wurden die Gele drei mal 20 Minuten mit 2 % Phosphorsäure gewaschen und 30 Minuten in Äquilibratorlösung (18 % v/v Ethanol, 2 % v/v Phosphorsäure und 15 % w/v Ammoniumsulfat) geschwenkt. Durch anschließende Zugabe von 2.5 ml Brilliant Blue Stocklösung in 250 ml Äquilibratorlösung wurden die Gele gefärbt. Vor dem Scannen wurde der Coomassie-Farbstoff wieder vollständig mit deionisiertem Wasser aus dem Gelhintergrund ausgewaschen. Dazu musste in einem Zeitraum von 24 - 72 Stunden das Wasser mehrmals gewechselt werden.

2.8.8 Dokumentation und Auswertung der Gele

Zur dauerhaften Dokumentation und Auswertung der Proteinmuster am Computer wurden die gefärbten Gele eingescannt. Hierzu wurde für die RuBPS-gefärbten Gele der Fluoreszenzscanner Molecular Imager FX verwendet. Gescannt wurde mit einer Auflösung von 0.1 mm unter Anregung von 532 nm durch den Laser. Die Bilder wurden mit einer Farbtiefe von 16 Bit in Graustufen im Tiff-Format abgespeichert.

Die Bilddateien wurden mit dem Programm Z3 (Version 2.0, Compugen) analysiert. Die Auswertung, die entsprechend des Handbuchs der Software durchgeführt wurde, läuft in drei nacheinander folgenden Schritten ab. Zunächst werden die gefärbten Proteine detektiert. Danach werden alle Proteine den Proteinen der Vergleichsgele zugeordnet (das so genannte „*matchen*“). Zuletzt wird die Proteinverteilung hinsichtlich auftretender und nicht auftretender Proteine und deren Quantität verglichen.

2.8.9 MALDI-TOF MS

Die Identität der Proteine aus den 2-D Gelen wurde im Massenspektrometer durch MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation / Time Of Flight*) Analysen bestimmt. Bei dieser Methode wird das aus der Gelmatrix ausgeschnittene Protein zuerst proteolytisch

gespalten. Dazu werden Proteasen verwendet, welche Proteine nach bekanntem Muster zerschneiden. Die molekularen Massen der proteolytischen Spaltprodukte werden danach mit Hilfe der MALDI-TOF Massenspektrometrie bestimmt. Es entsteht ein für jedes Protein einmaliges Fragmentmuster. Da das komplette Genom und damit auch das Proteom von *P. aeruginosa* bekannt sind, kann das Fragmentmuster für jedes Protein *in silico* vorhergesagt werden. Wenn die MALDI-Analyse genügend Signale liefert, dann lässt sich durch den Vergleich der gemessenen Größenverteilung der Proteinfragmente mit dem vorhergesagten Spektrum fast jedes Protein identifizieren.

Bei der MALDI-Methode wird die Probe für wenige Nanosekunden mit kurzzeitigem Laserlicht bestrahlt. Die elektronische Anregungsenergie führt zu einer lokalen Auflösung der Festkörperoberfläche (Matrix und Probe). Die Moleküle treten in die Gasphase über. Eine Elektrode, die sich in geringem Abstand gegenüber der Probe befindet, erzeugt ein elektrostatisches Feld, das je nach Polarität der Elektrode positive oder negative Ionen von der Probenoberfläche in Richtung des Analysators beschleunigt. Für MALDI-Untersuchungen werden Flugzeitmassenspektrometer (TOF, *time of flight*) als Analysatoren benutzt. Die Massenbestimmung erfolgt über die genaue Messung der Zeit, die zwischen dem Start der Ionen in der Probe bis zum Eintreffen am Detektor vergeht. Ionen mit unterschiedlichen m/z -Werten werden bei gleicher kinetischer Energie in der Beschleunigungsstrecke auf unterschiedliche Geschwindigkeiten gebracht. Bei bekannter Beschleunigungsspannung und Flugstrecke der Ionen in der feldfreien Driftstrecke lässt sich durch Messung der Flugzeit der Ionen das m/z -Verhältnis bestimmen. Die Kalibrierung erfolgt über Referenzsubstanzen mit bekannten Massen.

2.8.9.1 Probenaufbereitung für MS und Proteasebehandlung

Nachdem die Proteine aus dem Gel entfernt worden waren, wurden sie mit 200 μ l destilliertem Wasser für 5 Minuten gewaschen. Die Gelstückchen wurden dann mit dem 3 – 4 fachen Volumen an Acetonitril versetzt und für 10 Minuten inkubiert. Der Überstand wurde verworfen und die Gelfragmente in der SpeedVac getrocknet. Die getrockneten Gelstückchen wurden mit 10 μ l Trypsinlösung (2 μ g/ml Trypsin in 50 mM Ammoniumbicarbonat) überschichtet und für mindestens 12 Stunden bei 37 °C inkubiert. Zur Extraktion der Peptide aus der Gelmatrix wurde folgendermaßen verfahren: Nachdem 15 μ l 25 mM Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung hinzugegeben worden waren, wurden die Proben für 15 Minuten bei 37 °C geschüttelt. Danach wurden 50 μ l Acetonitril hinzugefügt und das Gemisch für weitere 15 Minuten bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Die Überstände mit den darin

enthaltenen Peptiden wurden abgenommen und in Eppendorfgläsern gesammelt. Um weitere Peptide zu extrahieren, wurden 50 µl 5 % Ameisensäure zu den Gelstückchen gegeben und für 15 Minuten bei 37 °C geschüttelt. Die Gelfragmente wurden dann erneut durch Zugabe von 50 µl Acetonitril und 15-minütiger Inkubation (schüttelnd; 37 °C) dehydratisiert. Die Überstände wurden zu den gesammelten Überständen gegeben und in der SpeedVac auf ca. 10 µl konzentriert.

2.8.9.2 Reinigung der durch Proteaseverdau gewonnenen Peptide

Die gewonnenen Peptidlösungen wurden mit ZipTips der Firma Millipore entsalzen und aufkonzentriert. Hierbei handelt es sich um Pipettenspitzen mit eingebrachtem „*reversed phase*“ C-18 Chromatografiematerial geringen Volumens, an welches Peptide gebunden, gewaschen und anschließend in einem sehr kleinen Volumen wieder eluiert werden können. Zur unmittelbaren Eluierung der gesamten Probe auf ein MALDI-Target wurden ZipTip_{µC18} eingesetzt.

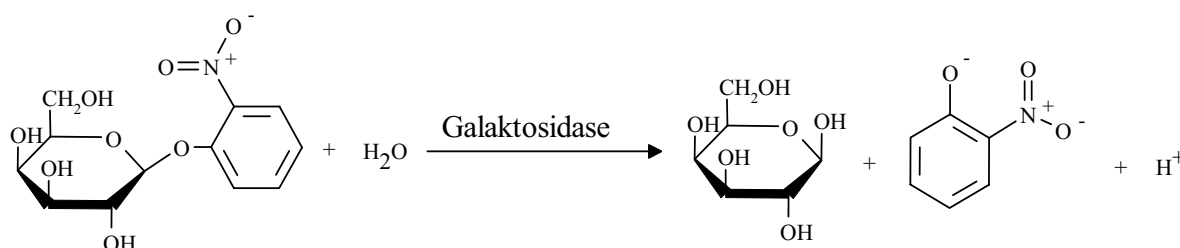
Die ZipTips wurden zunächst durch mehrmaliges Pipettieren einer Lösung von 0.5% Ameisensäure und 65% Methanol gewaschen und anschließend durch Pipettieren von 0.5% Ameisensäure und 5% Methanol äquilibriert. Danach erfolgte das Binden der Peptide am Trägermaterial durch zehnmaliges langsames Pipettieren der Probe, gefolgt von der Reinigung der Peptide durch fünfmaliges Pipettieren von je 10 µl frischer Waschlösung (0.5% Ameisensäure und 5% Methanol). Anschließend wurden die gereinigten Peptide durch mehrmaliges Pipettieren von 5 µl Elutionslösung (0.5% Ameisensäure und 65% Methanol) in ein Mikroliterreaktionsgefäß eluiert. Zur Vorbereitung der MS-Analyse wurden danach 0.5 µl Eluat mit 0.5 µl matrixgesättigter Elutionslösung (α -Cyano-4-hydroxy-Zimtsäure in 0.5% Ameisensäure und 65% Methanol) gemischt und auf einen Probenpunkt des MS-Targets platziert.

Alle weiteren Arbeitsschritte der MALDI-Analyse wurden im Labor von Dr. Lothar Jänsch an der GBF durchgeführt.

2.9 Enzymanalytik

2.9.1 Der β -Galaktosidase-Enzymtest

Zur Bestimmung der Promotoraktivität einzelner DNA-Sequenzen aus dem 5'-Bereich der zu analysierenden Gene können diese an das Reportergen *lacZ* (kodiert für β -Galaktosidase) gentechnisch gekoppelt werden. Die anschließend bestimmte β -Galaktosidaseaktivität ist dann ein Maß für die Transkription der Gene der jeweils getesteten Promotoren. Die Bestimmung der β -Galaktosidaseaktivitäten in *P. aeruginosa* wurde basierend auf dem Verfahren für *E. coli* nach Miller (1992) durchgeführt. Bei diesem Enzymtest wandelt die β -Galaktosidase das Substrat o-Nitrophenyl-galaktosid (oNPG) in o-Nitrophenolat um, dessen Absorption bei 420 nm photometrisch gemessen werden kann:



Die Probenentnahme erfolgte bei aerob kultivierten Zellen in der Regel nach 2 Stunden (1 ml), 3 Stunden (500 μ l) und 4 Stunden (250 μ l) auf Eis in 2 ml Reaktionsgefäßen. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand möglichst vollständig entfernt und die Proben eingefroren. Bei anaeroben Kulturen wurden je nach Wachstumsverhalten die ersten Proben nach 4-6 Stunden entnommen und dann noch zwei weitere Male nach jeweils 1.5 Stunden. Das Volumen richtete sich ebenfalls nach dem Wachstum. Bei Wildtypzellen wurde die Probenmenge bei der zweiten und dritten Entnahme der Zellzahl pro ml angepasst. Die Zellen wurden abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Sediment eingefroren.

Die aeroben Proben wurden in 500 μ l Z-Puffer, anaerobe Proben standardmäßig in 1 ml Z-Puffer resuspendiert. 250 μ l davon wurden mit 750 μ l Wasser in einer Küvette gemischt und die OD₅₇₈ bestimmt. Aerob wie anaerob wurden zu 250 μ l Probe 1 Tropfen Chloroform und ein Tropfen 0.1 %ige SDS-Lösung gegeben, geschüttelt und 9 Minuten bei RT inkubiert. Nach Zugabe weiterer 700 μ l Z-Puffer erfolgte der Reaktionsstart unter Zeitnahme durch Hinzufügen von 200 μ l oNPG-Lösung (4 mg/ml).

Es wurde so lange inkubiert, längstens jedoch 30 Minuten, bis sich eine deutliche Gelbfärbung des Reaktionsgemisches eingestellt hatte. Unter erneuter Zeitnahme wurde die

Reaktion durch Zugabe von 500 µl 1 M Na₂CO₃-Lösung gestoppt. Die Proben wurden 2 min zentrifugiert und 900 µl des Überstands bei 420 nm vermessen. Die β-Galaktosidase-Aktivitäten wurden nach folgender Gleichung bestimmt:

$$\text{Aktivität in Miller Units (MU)} = \frac{\Delta E_{420} \cdot 1000}{OD_{578} \cdot V \cdot t}$$

ΔE₄₂₀: Extinktionsunterschied des Reaktionsansatzes nach dem Abstoppen der Reaktion zur Ausgangsextinktion

OD₅₇₈: Optische Dichte der eingesetzten Zellsuspension

V [ml]: Volumen der eingesetzten Zellsuspension

t [min]: Zeit der Enzymreaktion bis zum Abstoppen (max. 30 min)

Z-Puffer	Na ₂ HPO ₄	60 mM
	NaH ₂ PO ₄	40 mM
	KCl	10 mM
	MgSO ₄	1 mM
	β-Mercaptoethanol	50 mM

2.9.2 Der Phosphotransacetylase-Enzymtest

Es wurden die Enzymaktivitäten der Phosphotransacetylase (Pta) im zellfreien Proteinextrakt von aerob kultivierten *P. aeruginosa*-Zellen mit denen von fermentativ kultivierten Zellen verglichen. Die Bestimmung der Pta-Aktivitäten in *P. aeruginosa* wurde basierend auf dem Verfahren für *Chlostridium butylicum* nach Thompson & Chen (1990) mit den hier beschriebenen Modifikationen durchgeführt. Bei diesem Enzymtest wandelt die Phosphotransacetylase die Substrate Acetyl-Phosphat und Coenzym A in Acetyl-S-CoA um, wobei die Absorptionzunahme der Thioester-Bindung bei 233 nm photometrisch verfolgt werden kann:



2.9.2.1 Herstellung eines zellfreien Proteinextraktes

Aerobe Vorkulturen in LB-Medium wurden mit einer Einzelkolonie beimpft und über Nacht bei 37 °C und 200 rpm schüttelnd inkubiert. Von diesen Vorkulturen wurden jeweils 2 frische 150 ml Hauptkulturen mit einer OD₅₇₈ von 0.05 in LB-Medium mit Zugabe von 10 mM Gluconsäure und 10 mM Pyruvat angesetzt und aerob bei 37 °C und 200 rpm bis zu einer OD₅₇₈ von 0.3 kultiviert. Jeweils einer der beiden Ansätze wurde in vorgelegtes 150 ml 4 °C kaltes LB-Medium überführt, um möglichst schnell das Wachstum zum Stillstand zu bringen, und 20 Minuten auf Eis inkubiert. Die anderen Ansätze wurden anschließend direkt in vorbereitete Anaerobflaschen, in welche Pyruvat mit einer Endkonzentration von 20 mM vorgelegt waren, überführt und bei 37 °C für 24 Stunden inkubiert. Danach wurden auch diese Ansätze in 150 ml 4 °C kaltes LB-Medium gegossen und 20 Minuten auf Eis inkubiert.

Die gekühlten Zellen wurden bei 8000 g und 4 °C für 10 Minuten abzentrifugiert. Die Zellsedimente wurden in 50 ml Tris/KCl-Puffer suspendiert und nach erneuter Zentrifugation bei 8000 g nochmals in 10 ml Tris/KCl-Puffer gewaschen und abzentrifugiert. Die Zellen wurden schließlich in 1 ml Tris/KCl-Puffer suspendiert, in neue Mikroreaktionsgefäße überführt und darin direkt mittels Ultraschall bei 4 °C auf Eis aufgeschlossen. Der Ultraschallaufschluss selbst erfolgte bei einer Begrenzung der Leistungsabgabe und Pulsdauer auf jeweils 50 % für 4 mal 30 Sekunden, wobei zwischen den Beschallungen einminütige Pausen eingelegt wurden, um eine zu starke Erwärmung der Proben zu vermeiden. Danach wurden die Zelltrümmer bei 16000 g und 4 °C für 10 Minuten abzentrifugiert. Der gelbliche Überstand wurde anschließend für 2 Stunden bei 125 000 g und 4 °C in einer Ultrazentrifuge zentrifugiert, um störende Membranbestandteile und andere unlösliche Zelltrümmer zu entfernen. Der klare Überstand wurde als zellfreier Proteinextrakt (1 - 1.5 mg Protein pro ml) entweder direkt für den Enzymtest (siehe 2.9.2.2) weiter verwendet oder bei -20 °C gelagert.

2.9.2.2 Der Pta-Enzymtest

5 - 20 µg des Proteinextraktes aus 2.9.2.1 sowie die Substrate CoA (210 µM) und Acetylphosphat (14.5 mM) wurden mit soviel Tris/KCl-Puffer versetzt, dass sich immer ein Endvolumen von 600 µl ergab.

Dabei wurden die beiden Substrate und der Puffer mit dem Proteinextrakt jeweils getrennt voneinander auf 30 °C erwärmt. Zuerst wurde alles bis auf das Acetylphosphat in die Quarzküvette gegeben und diese in das UV/VIS-Spektrometer „Lambda 2“ (Perkin Elmer) eingesetzt, welches mit Hilfe der Software „UV-Winlab“ (Perkin Elmer) über einen

angeschlossenen Computer gesteuert wurde. Dazu wurde das Unterprogramm „time drive“, das die zeitliche Änderung der Absorption bei einer ausgewählten Wellenlänge aufzeichnet, mit den folgenden Einstellungen aufgerufen: 233 nm für die Wellenlänge der Absorptionsmessung, 0.2 Sekunden als Messintervall und 5 Minuten für die gesamte Messdauer. Zuerst wurde 1-2 Minuten die Basislinie aufgezeichnet. Danach wurde die eigentliche Pta-Enzymreaktion durch Zugabe von Acetyl-CoA direkt in die Quarzküvette gestartet. Die Bildung des Produktes Acetyl-CoA und damit die Enzymaktivität konnte dabei durch die zeitliche Zunahme der Absorption bei 233 nm verfolgt werden ($\Delta E = 4.44 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1} = 4.44 \text{ cm}^2 \mu\text{mol}^{-1}$). Aus den Steigungen der Kurven wurde die Volumenaktivität (U/ml) berechnet. 1 U entspricht dabei der Bildung von 1 μmol Acetyl-S-CoA in 60 min.

Die Proteinkonzentrationen der zellfreien Proteinextrakte wurden mit dem BCA-Test („*enhanced test*“) bestimmt, wie in der Anleitung des Herstellers Sigma (Deisenhofen) beschrieben. Die Volumenaktivität wurde in die spezifische Aktivität (U/mg) umgerechnet.

Tris/KCl-Puffer	Tris/HCl (pH 8.0)	100 mM
	KCl	100 mM

2.10 Analyse der Umsetzung von Substraten zu Fermentationsprodukten mittels HPLC-Analyse der Wachstumsmedien

Die Bakterien wurden in OS- oder M9-Minimalmedium (siehe 2.4.2 und 2.4.3) unter anaeroben Bedingungen kultiviert (siehe 2.5.3.2). In bestimmten Zeitintervallen wurden jeweils 1 ml der Bakterienkultur mit Spritzen steril entnommen. Nach dem Abzentrifugieren der Bakterien wurde der Kulturüberstand sterilfiltriert (Porengröße der Spritzenvorsatzfilter: 0.2 μm).

Die verwendete HPLC-Anlage (Jasco) wurde mit einer 'Eurokat H'-Ionenaustauschersäule (300 x 8 mm, Knauer, Berlin) und einer Vorsäule (50 x 8 mm, Knauer, Berlin) bei einer Temperatur von 60 °C betrieben. Die Matrix bestand in beiden Säulen aus sulfoniertem Polystyrol (Partikelgröße: 10 μm). Als Laufmittel diente 10 mM Schwefelsäure, welche durch einen 0.45 μm Filter filtriert (Millipore) und anschließend am Vakuum entgast wurde, mit einer Flussrate von 0.6 ml/min. Es wurden jeweils 20 μl Probe eingespritzt und die Laufzeit der Messung betrug 30 min. Die Erfassung und Auswertung der Chromatogramme und Spektren erfolgte mit der Software Borwin (Jasco). Eluierte Substanzen konnten mit dem RI-Detektor durch ihre Lichtbrechung und mit dem Photodiodenarray-Detektor durch ihre Absorption über einen Bereich bei 190-600 nm verfolgt werden. Die Fermentationsprodukte wurden durch Vergleich ihrer Elutionspositionen und ihrer Absorptionsspektren mit Vergleichssubstanzen in parallel vermessenen Eichläufen identifiziert. Die Zuordnung der Peakflächen zu den korrespondierenden Konzentrationen der Komponenten erfolgte dabei über Kalibriergeraden, die aus den Messwerten von Eichlösungen in verschiedenen Konzentrationen erstellt wurden.

2.11 Methoden für die *in silico*-Analyse des Genoms von *Pseudomonas aeruginosa*

Zur Untersuchung des vollständig sequenzierten *P. aeruginosa*-Genoms (Stover *et al.*, 2000) nach möglichen Genen, die für fermentative Enzyme des anaeroben Stoffwechsels kodieren, wurden zuerst die entsprechenden bekannten Gensequenzen analoger Enzyme aus *E. coli* über den *Colibri*-Server (Pasteur Institut, Paris, Frankreich) oder aus *B. subtilis* über den *Subtilist*-Server (Pasteur Institut, Paris, Frankreich) herausgesucht. Mit diesen wurde dann eine *TBLASTX*-Datenbanksuche in der *P. aeruginosa* spezifischen Genom-Datenbank *Microbial Genomes Blast Databases* (am NCBI, Bethesda, MD) durchgeführt. Die so gefundenen *P. aeruginosa*-Gensequenzen wurden schließlich noch einer *BLASTP*-Suche in *genebank nr* (*non redundant*: enthält alle Einträge diverser Proteindatenbanken sowie Übersetzungen aus Genebank) unterzogen, um Informationen über Sequenzidentitäten zu weiteren Enzymen aus anderen Organismen zu erhalten. Zusätzlich wurde die genomische Umgebung der so gewonnenen Kandidaten, wie oben beschrieben, nach weiteren proteinkodierenden Bereichen (ORFs) untersucht, so dass daraus mögliche Operonstrukturen abgeleitet werden konnten.

Soweit nicht anders angegeben, wurde für alle Suchdurchläufe die *Default*-Einstellung des jeweiligen Programms verwendet. Die Internet-Adressen der Datenbanken und Programme sind im Literaturverzeichnis angegeben.

2.11.1 Datenbanksuche mit den *BLAST*-Programmen

Analysen der kompletten *P. aeruginosa*-Genomsequenz wurden mit Hilfe der *Microbial Genomes Blast Databases* und dem Programm *TBLASTX* über den BLAST-Server des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, Bethesda, MD) durchgeführt (Altschul *et al.*, 1990; Altschul *et. al.*, 1997).

Vergleiche der so gewonnenen Proteinsequenzen mit den ähnlichen Sequenzen anderer Organismen wurden mit der Datenbank *genebank nr* und dem Programm *BLASTP* durchgeführt.

Die beiden Suchprogramme benutzten den **BLAST**-Algorithmus (**B**asic **L**ocal **A**lignment **S**earch **T**ool). BLAST beginnt die Suche mit einigen kleinen n-Meren, für die alle gefundenen Einträge mit aussichtsreichen Entsprechungen in die weitere Suche mitaufgenommen werden. Diese n-Mere werden schrittweise verlängert und der Ähnlichkeitsgrad der gelisteten Sequenzen mit der gesuchten Sequenz statistisch bewertet. Das Ergebnis der Suche ist eine

Liste mit ähnlichen Sequenzen und der statistischen Signifikanz der Identität. Diese entspricht der Zufälligkeit einer beliebigen Sequenz, mit der Suchsequenz identisch zu sein. Ein Wert von 0 bedeutet Identität und mit steigendem Wert nimmt die Ähnlichkeit ab.

2.11.2 Matrixsuche mit der PRODORIC-Datenbank

Die **PRODORIC**-Datenbank (TU Braunschweig) enthält neben den Sequenzinformationen aller bekannten Bindestellen der Transkriptionsfaktoren Anr/Dnr, IHF, ArgR, Fur, LasR, RhlR und MexR von *P. aeruginosa* (Münch *et al.*, 2003) auch Programme zur Analyse von DNA-Sequenzen. Das Programm „*Weight Matrix Search*“ bietet vor allem bei der Identifizierung von noch unentdeckten Protein-DNA-Bindestellen durch gewichtete DNA-Matrizen eine hohe Vorhersagegenauigkeit. Die einzelnen DNA-Matrizen sind dabei aus den experimentellen Daten der entsprechenden Transkriptionsfaktoren, die in der Literatur vorhanden sind, berechnet worden.

2.11.3 Bezug von Sequenzen und anderen Informationen

Nukleinsäure- und Proteinsequenzen konnten entweder über den *Colibri*-Server (Pasteur Institut, Paris, Frankreich), über *Microbial Genomes Blast Databases* (auf dem NCBI-Server) oder über *SWISS-PROT* (enthält annotierte Proteinsequenzen; EMBL Data Library, University of Geneva, Swiss) erhalten werden.

Andere proteinspezifische Informationen sowie Bioinformatik-Tools wurden über das *SRS* (*Sequenz Retrieval System*; EMBL-EBI, Hinxton, Cambridge, UK), über *Entrez* (auf dem NCBI-Server) oder über *Expasy* (Swiss Institute of Bioinformatics, Geneva, Swiss) bezogen.

3 Ergebnisse und Diskussion

P. aeruginosa wurde bisher als ein opportunistisches Pathogen beschrieben, welches aerobe Bedingungen bevorzugt (Palleroni, 1992). Kürzlich durchgeführte Chemostat-Experimente deuten aber darauf hin, dass eher ein mikroaerobes Milieu das optimale Wachstum von *P. aeruginosa* begünstigt (Sabra *et al.*, 2002). Unter komplettem Sauerstoffabschluss wächst *P. aeruginosa*, indem es in Anwesenheit der Elektronenakzeptoren Nitrat oder Nitrit eine Denitrifikation durchführt (Davies *et al.*, 1989).

3.1 Der bisher bekannte fermentative Energiemetabolismus von *Pseudomonas aeruginosa*

Obwohl *P. aeruginosa*, wie allgemein alle Pseudomonaden, üblicherweise als ein nicht-fermentierendes Bakterium klassifiziert wird (Palleroni, 1992), ist die Fermentation von Arginin in *P. aeruginosa* einschließlich deren Regulation gut untersucht worden (siehe Kap. 1.3.2.2; Vander Wauven *et al.* ; 1984, Galimand *et al.* ; 1991; Gamper *et al.* ; 1991). Ohne Arginin oder externe Elektronenakzeptoren tritt bei *P. aeruginosa* ein Energie-Mangelzustand auf und als Folge davon sinkt die Lebendzellzahl drastisch von 10^9 auf 5×10^5 Zellen pro ml (Binnerup & Sorensen, 1993).

Zu Beginn dieser Arbeit stellte sich nun die Frage, ob *P. aeruginosa* weitere bisher unbekannte Fermentationswege besitzt, die ein Wachstum oder Überleben unter anaeroben Bedingungen ohne Nitrat, Nitrit oder Arginin ermöglichen. Als Beispiele wurde dabei der Gram-negative Modellorganismus *E. coli* und das als „strikt aerobe“ bezeichnete Bakterium *B. subtilis* herangezogen, bei dem erst durch genauere Untersuchungsmethoden unerwartete fermentative Stoffwechselwege entdeckt wurden (Cruz Ramos *et al.*, 2000; Nakano *et al.*, 1997). *B. subtilis* benötigt entweder Glucose und zusätzlich Aminosäuren oder Glucose und Pyruvat für eine Fermentation nach dem Typ der „Gemischten Säuregärung“. Aber im Gegensatz zu einem Bakterium mit einer effektiven Glucose-Fermentation, wie z.B. *E. coli* (Stoffwechselwege: siehe Abb. 2 in Kap. 1.1.2), fehlt *B. subtilis* das Enzym Pyruvat-Formiat-Lyase. Dieses Enzym ist im Energie-Metabolismus von *E. coli* hauptsächlich für die effiziente Koordination von Respiration und Fermentation verantwortlich (Abb. 2 in 1.1.2; Böck & Sawers, 1996).

3.2 *in silico*-Identifizierung alternativer Fermentationswege in *Pseudomonas aeruginosa*

Im Rahmen meiner Diplomarbeit wurden BLAST-Analysen des komplett sequenzierten Genoms von *P. aeruginosa* PAO1 durchgeführt, um Gene mit möglicher Beteiligung am anaeroben Energiemetabolismus in *P. aeruginosa* zu finden (Eschbach, 1999). Dort wurden bereits zwei Genloci identifiziert, deren abgeleitete Proteinsequenzen hohe Identitäten zu bekannten und gut untersuchten Fermentationsenzymen aus *E. coli* aufwiesen. Die Ergebnisse dieser theoretischen Untersuchungen wurden auch im *Pseudomonas* Annotation Projekt (PseudoCAP) verwendet und sind auf der Internetseite des *Pseudomonas*-Genomprojektes (www.pseudomonas.com) gespeichert.

Zu Beginn dieser Arbeit wurden die BLAST-Analysen wiederholt, wobei dieses Mal die Suche ausschließlich auf Gene mit möglicher Beteiligung an neuen Fermentationswegen in *P. aeruginosa* konzentriert wurde.

Die BLAST-Suche lieferte ein mögliches Operon aus zwei ORFs, die für Proteine mit sehr hohen Sequenzidentitäten zu den Enzymen Phosphotransacetylase (Pta) und Acetat-Kinase (AckA) aus *E. coli* kodieren (Tab. 6). Diese in *E. coli* gut untersuchten Enzyme katalysieren die Reaktion von Acetyl-CoA über Acetylphosphat zu Acetat im fermentativen Modus unter gleichzeitiger Bildung von ATP mittels Substratphosphorylierung.

Weiterhin konnte im *P. aeruginosa*-Genom ein ORF identifiziert werden, dessen Genprodukt eine hohe Sequenzidentität zur fermentativen, NAD^+ -abhängigen D-Lactat-Dehydrogenase (LdhA) aus *E. coli* aufweist, welche Pyruvat in Lactat bei gleichzeitiger Reoxidierung von NADH zu NAD^+ umwandelt. Stromaufwärts von *ldhA* befindet sich das Gen *gacS* (früher als *lemA* bezeichnet), welches 62 %ige Sequenzidentität zu *gacS* (*lemA*) aus *Pseudomonas syringae* besitzt. Dieses Gen kodiert für den Sensor GacS des 2-Komponenten-Regulators GacA / GacS.

Auch ein Genlocus, dessen Genprodukt für eine Alkohol-Dehydrogenase (AdhA) kodiert, konnte gefunden werden. Die Zuordnung dieses ORFs zum fermentativen Stoffwechsel allein aufgrund von Sequenzanalysen ist jedoch nicht möglich, da im *P. aeruginosa*-Genom sehr viele ORFs (insgesamt etwa 15) mit hohen Sequenzidentitäten zu Alkohol-Dehydrogenasen vorhanden sind. Die gleiche Schwierigkeit ergibt sich für das Enzym des zweiten Reaktionsschrittes (der Umwandlung von Acetyl-CoA in Acetaldehyd, siehe Abb. 10). Es gibt etwa 10 Genloci, die für mögliche Aldehyd-Dehydrogenasen kodieren. Dieser enzymatische

Schritt der Umwandlung von Acetyl-CoA in Ethanol läuft in *E. coli* grundlegend anders. In *E. coli* gibt es ein Fusionsprotein aus einer Alkohol-Dehydrogenase und einer Acetaldehyd-Dehydrogenase (AdhE), welches die beide Schritte von Acetyl-CoA zu Ethanol unter fermentativen Bedingungen katalysiert (siehe Abb. 2 in Kap. 1.1.2).

Die N-terminalen 500 Aminosäuren des abgeleiteten Genproduktes vom *pycA*-Genlocus weisen eine hohe Sequenzidentität zu einer Pyruvat-Carboxylase (PycA) auf. Dieses Enzym ist in *B. subtilis* für die Umwandlung von Pyruvat in Oxalacetat unter fermentativen Bedingungen verantwortlich. Das Oxalacetat wird danach von den Enzymen des reduktiven Citratzyklus-Halbkreises in das Fermentationsprodukt Succinat umgewandelt.

Das Operon *aceAB*, welches für die Untereinheiten der Pyruvat-Dehydrogenase in *P. aeruginosa* kodiert, ist bereits untersucht und beschrieben worden (Rae *et al.* 1997, Jeyaseelan *et al.* 1980). Weiterhin wurden drei Genloci (PA3415, PA3416 und PA3417) identifiziert, die für eine Dihydrolipoamid-acetyltransferase und eine mögliche Pyruvat-Dehydrogenase E1-Komponente (α and β Untereinheiten) kodieren (Tab. 6). Die Genprodukte dieser noch nicht in der Literatur beschriebenen Loci könnten eine Alternative zur bekannten Pyruvat-Dehydrogenase in *P. aeruginosa* mit abweichender Regulation darstellen.

Es wurden jedoch keine Loci in *P. aeruginosa* gefunden, die für Untereinheiten der Pyruvat-Formiat-Lyase kodieren könnten. Die Genprodukte des entsprechenden Operons *pflABCD* in *E. coli* katalysieren die Umwandlung von Pyruvat in Acetyl-CoA und Formiat (Abb. 2 in 1.1.2). Ebenfalls konnten keine ORFs in *P. aeruginosa* identifiziert werden, die für eine mögliche Formiat-Hydrogen-Lyase kodieren. Der entsprechende Enzymkomplex FHL in *E. coli* katalysiert die Umwandlung von Formiat in Kohlendioxid und Wasserstoff (Abb. 2 in 1.1.2). Das Fehlen dieser in *E. coli* für die Glucose-Fermentation essentiellen Enzyme deutet auf einen grundlegend unterschiedlichen Fermentations-Metabolismus zwischen diesen beiden Gram-negativen Bakterien hin.

Alle Ergebnisse dieser *in silico*-Analysen wurden in der Tab. 6 dargestellt. In der Tabelle wurden dabei die englischen Namen aufgelistet, im laufenden Text dagegen die deutschen Enzymnamen.

Tab. 6 Ergebnisse der BLAST-Analyse zur *in silico*-Identifizierung von Genloci mit möglicher Beteiligung am fermentativen Energiemetabolismus in *P. aeruginosa*.

Die Analyse wurde wie in 2.11.1 beschrieben durchgeführt. Zur ursprünglichen Suche wurden charakterisierte Gene aus anderen Organismen (meist *E. coli* oder *B. subtilis*) verwendet. Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen der dabei identifizierten ORFs in *P. aeruginosa* wurden unter Verwendung des BlastP-Programms mit allen Proteinsequenzen der SWISS-PROT-Datenbank verglichen.

PA-Nummer	Gen-name	Genprodukt (Enzymname)	Höchste Identität der Aminosäuresequenz zu (% der Identität; Enzymname; Organismus)
PA0835	<i>ackA</i>	acetate kinase	52; acetate kinase; <i>Deinococcus radiodurans</i> 44; AckA; <i>E. coli</i>
PA0836	<i>pta</i>	phosphate acetyltransferase (oder: phosphotransacetylase)	75; phosphate acetyltransferase; <i>Pseudomonas syringae</i> 53; Pta; <i>E. coli</i>
PA0927	<i>ldhA</i>	fermentative NAD ⁺ -dependent D-lactate dehydrogenase	77; D-lactate dehydrogenase; <i>Pseudomonas putida</i> 54; LdhA; <i>E. coli</i>
PA5427	<i>adhA</i>	alcohol dehydrogenase	71; Zn-dependent alcohol dehydrogenase; <i>Azotobacter vinelandii</i>
PA1400	<i>pycA</i>	probable pyruvate carboxylase	N-terminalen 500 Aminosäuren: 37; pyruvate carboxylase; <i>Oceanobacillus iheyensis</i> C-terminalen 700 Aminosäuren: 50; carbamoyl- phosphate synthase/carboxyl transferase; <i>Caulobacter crescentus</i>
PA5015	<i>aceA</i> (<i>aceE</i>)	pyruvate dehydrogenase (PDH-E1 subunit) ¹	89; pyruvate dehydrogenase, E1 component; <i>Pseudomonas putida</i> KT2440 61; AceE; <i>E. coli</i>
PA5016	<i>aceB</i> (<i>aceF</i>)	dihydrolipoamide acetyltransferase (PDH-E2 subunit) ¹	67; pyruvate dehydrogenase complex, E2 component, dihydrolipoamide acetyltransferase; <i>Pseudomonas syringae</i> pv. tomato str. 47; AceF; <i>E. coli</i>
PA3415	-	probable dihydrolipoamide acetyltransferase (PDH-E2 subunit)	78; pyruvate/2-oxoglutarate dehydrogenase complex, dihydrolipoamide acyltransferase (E2) component, <i>Azotobacter vinelandii</i>
PA3416	-	probable pyruvate dehydrogenase (PDH-E1 subunit β chain)	85; pyruvate/2-oxoglutarate dehydrogenase complex, dehydrogenase (E1) component, eukaryotic type, alpha subunit; <i>Azotobacter vinelandii</i>
PA3417	-	probable pyruvate dehydrogenase (PDH-E1 subunit α chain)	78; pyruvate/2-oxoglutarate dehydrogenase complex, dehydrogenase (E1) component, eukaryotic type, alpha subunit; <i>Azotobacter vinelandii</i>

¹ publiziert in Jeyaseelan *et al.* (1980) und Rae *et al.* (1997)

Anhand dieser Ergebnisse der *in silico*-Analysen wurde ein erstes Modell für die Glucose/Gluconat-Fermentationswege in *P. aeruginosa* aufgestellt (Abb. 10). Alle neu identifizierten Enzyme sind dabei nach dem Modell der charakterisierten Glucose-Fermentationswege in *E. coli* angeordnet (siehe Abb. 2 in der Einleitung). Diese direkte Übernahme von Enzymreaktionen aus *E. coli* für entsprechende Stoffwechselwege in *P. aeruginosa* ist nur als erste Arbeitshypothese zu verstehen, da sich diese beiden Gram-negativen Bakterien unter anderem auch in ihrem Glucose/Gluconat-Metabolismus grundlegend unterscheiden, worauf schon in Kap. 1.3.1 hingewiesen worden ist. In Abb. 10 ist zu sehen, dass bei den Enzymreaktionen, die Glucose in Pyruvat umwandeln, doppelt so viele Reduktionsäquivalente gebildet werden wie bei den entsprechenden Reaktionen des oxidierten Zuckers Gluconat.

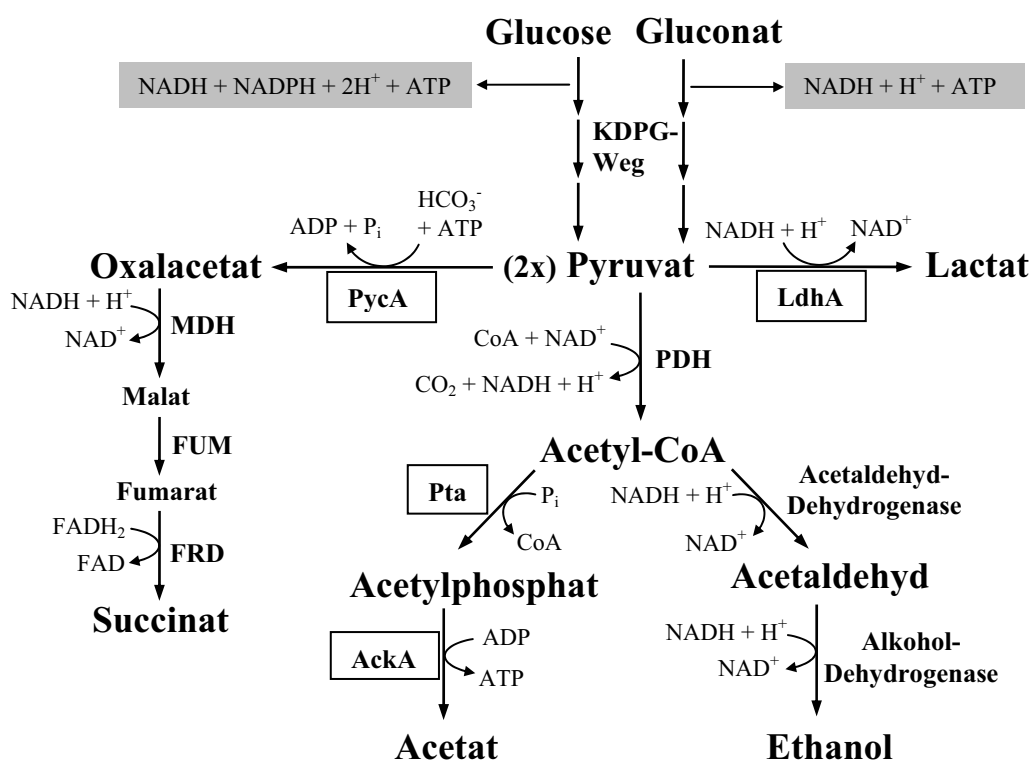


Abb. 10 Erstes Modell der Glucose/Gluconat-Fermentationswege in *P. aeruginosa* anhand von *in silico*-Analysen.

Der KDPG-Weg (Entner-Doudoroff-Weg) ist in Abb. 4 (siehe Kap. 1.3.1) näher erläutert. Die von neu identifizierten Genen abgeleiteten fermentativen Enzyme sind eingerahmt.

PycA, Pyruvat-Carboxylase; LdhA, NAD⁺-abhängige Lactat-Dehydrogenase; PDH, Pyruvat-Dehydrogenase; Pta, Phosphotransacetylase; AckA, Acetatkinase; Enzyme aus dem reduktiven Citratzyklus-Halbkreis: MDH, Malat-Dehydrogenase; FUM, Fumarase; FRD, Fumarat-Reduktase.

3.3 Das anaerobe Überleben von *Pseudomonas aeruginosa* ohne externe Elektronenakzeptoren

3.3.1 Kein anaerobes Wachstum von *P. aeruginosa* in Anwesenheit von Glucose, Gluconat oder Pyruvat

Das im vorhergenden Kapitel postulierte Modell einer Glucose/Gluconat-Fermentation in *P. aeruginosa* (Abb. 10) sollte nun experimentell verifiziert werden.

Daher wurde in dieser Arbeit untersucht, ob *P. aeruginosa* durch Fermentation von Glucose, Gluconat, Pyruvat oder Kombinationen aus diesen Substraten dazu in der Lage ist, unter anaeroben Bedingungen zu wachsen. Doch keines dieser Substrate erlaubte eine Vermehrung der Zellzahl von *P. aeruginosa* im anaeroben Minimalmedium, welches keine externen Elektronenakzeptoren wie z.B. Nitrat oder Nitrit enthielt (nicht gezeigt). Selbst in dem Komplex-Medium LB konnte keine Erhöhung der OD₅₇₈ gemessen werden. Diese Beobachtungen stimmen mit früheren Untersuchungen überein, welche zeigten, dass das anaerobe Wachstum von *P. aeruginosa* auf Nitrat-Respiration und Arginin-Fermentation beschränkt ist (Krieger, 2001; Vander Wauven *et al.*, 1984).

3.3.2 Pyruvat unterstützt das Überleben von *Pseudomonas aeruginosa* unter anaeroben Bedingungen

Wurde *P. aeruginosa* jedoch aerob vorkultiviert und anschließend als verdünnte Zellsuspension (OD₅₇₈ ungefähr 0.25) in ein anaerobes Milieu mit Pyruvat überführt, blieb die Zellzahl über mehrere Tage konstant (Abb. 11 in Kap. 3.3.2.1).

3.3.2.1 Bestimmung der Lebendzellzahl unter anaeroben Bedingungen

Dazu wurde *P. aeruginosa* aerob in OS-Minimalmedium mit 10 mM Gluconat und 10 mM Pyruvat kultiviert. Nach 12 Stunden (bei einer OD₅₇₈ von 1.6) wurden die Zellen geerntet, das Zellpellet gewaschen und in soviel OS-Medium mit 2.5 g/l Hefe-Extrakt suspendiert, dass die Bakteriensuspension eine OD₅₇₈ von ungefähr 0.25 aufwies. Diese Zellsuspension wurde nach Zugabe von Pyruvat, Gluconat, Glucose oder ohne weitere Zusätze unter anaeroben Bedingungen mehrere Wochen inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden steril Proben entnommen und sowohl die OD₅₇₈ (siehe 2.5.2.1) als auch die Lebendzellzahl von *P. aeruginosa* anhand kultivierbarer Zellen auf LB-Agarplatten (CFU) bestimmt (siehe 2.5.2.2).

Nur in dem Versuchsansatz, in welchem *P. aeruginosa* mit dem Zusatz von 20 mM Pyruvat im anaeroben Milieu inkubiert worden war, konnte eine gleich bleibende Lebendzellzahl (CFU) über eine Zeitspanne von 17 Tagen beobachtet werden (-■- in Abb. 11 b). Im Gegensatz dazu verringerte sich im Medium ohne Pyruvat die Zellzahl von *P. aeruginosa* schon von Beginn der anaeroben Inkubation an (-□- in Abb. 11 b). Anhand der linearen Kurve in der halblogarithmischen Darstellung der CFU ist zu erkennen, dass dieser Abfall der Lebendzellzahl bis zu einem Wert von 0.7 % des Anfangswertes logarithmisch erfolgt. Auch in den Versuchsansätzen mit Glucose und Gluconat fiel die Zellzahl von Anfang an vergleichbar mit dem Ansatz ohne weitere Zusätze (nicht gezeigt). Daraus folgt, dass weder Glucose noch Gluconat *P. aeruginosa* unter anaeroben Bedingungen ohne externe Elektronenakzeptoren ein Überleben ermöglicht.

Die Werte der Optischen Dichte zeigen für die beiden Ansätze mit und ohne Pyruvat (Abb. 11 a) die gleichen zeitlichen Verläufe wie die entsprechenden Kurven der CFU-Messwerte (Abb. 11 b). Da aber die OD₅₇₈ vom Anfangswert 0.3 nur auf einen Endwert von 0.1 sinkt und dort stagniert, bedeutet dies, dass die Messung der Optischen Dichte das Verhältnis zwischen lebenden und toten Zellen nicht richtig widerspiegelt. Im Folgenden wurde daher auf die Bestimmung der OD₅₇₈-Werte verzichtet und nur die genauere CFU-Methode verwendet.

In der Literatur ist bereits beschrieben worden, dass *P. aeruginosa*-Zellen unter Energie-Mangelbedingungen zehnmal mehr Kolonien bildeten, wenn die LB-Agarplatten unter denitrifizierenden Bedingungen statt unter aeroben Bedingungen inkubiert wurden (Binnerup & Sorensen, 1993). Dies bedeutet, dass der Mangel an Energiesubstraten in einer Subpopulation von Zellen resultierte, die unter denitrifizierenden aber nicht mehr unter aeroben Wachstumsbedingungen detektierbar war. Diese Diskrepanz um den Faktor 10 wurde auch zwischen aerob kultivierbarer Zellzahl (CFU) und der höheren Zahl an „lebendigen aber nicht-kultivierbaren“ Zellen beobachtet, welche nach Aktivitätsfärbung auf einem Membranfilter direkt im Mikroskop ausgezählt wurden (beschrieben als „viable but non-culturable cells“ in Binnerup & Sorensen, 1993). Wahrscheinlich sind diese nicht-kultivierbaren Zellen Populationen von Mutanten, die an anaerobes Wachstum adaptiert sind und gleichzeitig die Fähigkeit verloren haben, aerob zu wachsen (Nystrom, 2003). Aber auch andere Möglichkeiten werden in der Literatur diskutiert, wie z.B. eine kritische Betrachtung der verschiedenen Färbemethoden zur Detektion von lebendigen Zellen.

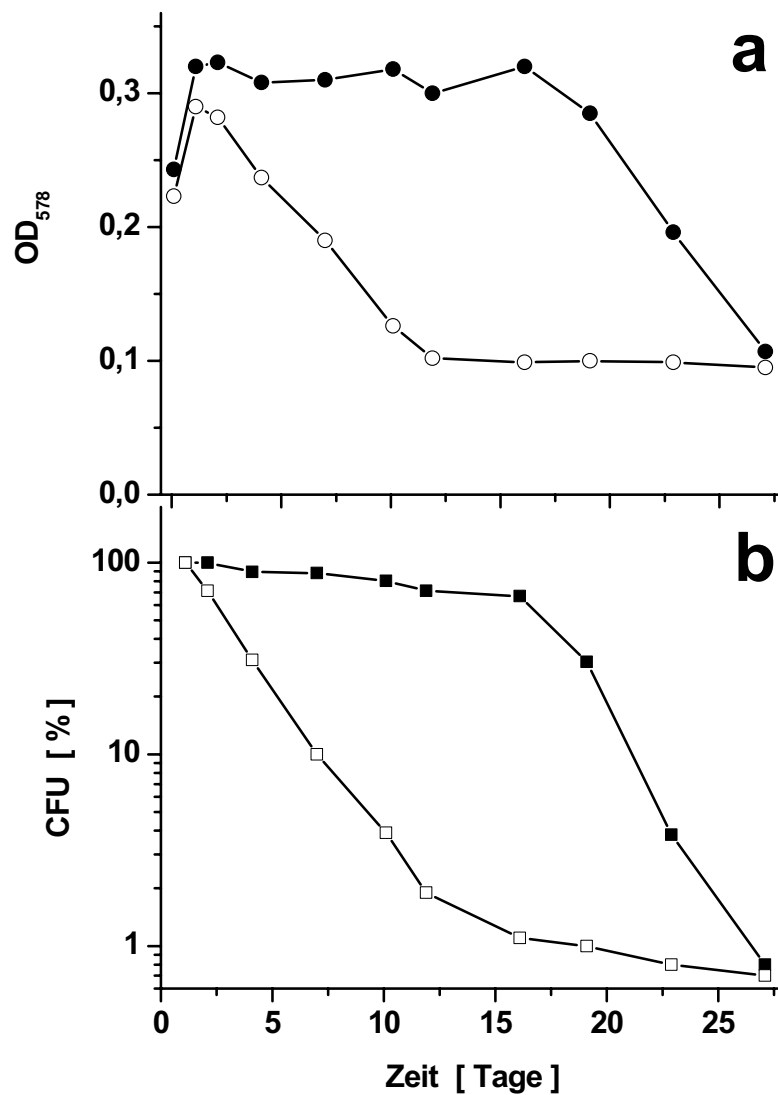


Abb. 11 Gegenüberstellung der Ergebnisse von zwei unterschiedlichen Methoden zur Zellzahlbestimmung des *P. aeruginosa* Wildtyps, welcher unter anaeroben Bedingungen mit Pyruvat (geschlossene Symbole) und ohne Pyruvat (offene Symbole) inkubiert wurde.

(a) Optische Dichte (578 nm) von *P. aeruginosa* mit Zusatz von 20 mM Pyruvat (●) und ohne weitere Zusätze (○).

(b) Lebendzellzahlen von *P. aeruginosa* anhand colony forming units (CFU) auf LB-Agarplatten. Die Anfangswerte der nach 26 Stunden anaerober Inkubation auf aeroben LB-Agarplatten bestimmten CFUs sind zum besseren Vergleich auf 100 % gesetzt worden. Bei PAO1 mit Pyruvat (■) entsprechen 100 % = $6.8 \cdot 10^8$ Zellen / ml und bei PAO1 ohne Pyruvat (□) entsprechen 100 % = $5.8 \cdot 10^8$ Zellen / ml.

3.3.2.2 Alternative Bestimmung der Lebendzellzahl durch differentielle Fluoreszenzfärbung von lebenden und toten Zellen

Wegen den oben erwähnten Schwierigkeiten wurde ein von der Messung der OD₅₇₈ und der CFU unabhängiger Ansatz zur Unterscheidung zwischen lebenden und toten *P. aeruginosa*-Zellen erforderlich. Es wurde eine Methode ausgewählt, bei der die Zellen mit zwei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen unter Verwendung des *LIVE/DEAD® BacLight Bacterial Viability Kits* (Molecular Probes, siehe 2.5.2.3) angefärbt wurden. Diese beiden Farbstoffe SYTO 9 und Propidium-Iodid unterscheiden sich in ihrer Fähigkeit, durch die Zellmembran in das Cytoplasma von Bakterienzellen zu gelangen. Der eine Farbstoff (SYTO 9), der grün fluoresziert und an die DNA bindet, färbt generell alle Bakterien an – sowohl solche mit intakter als auch solche mit beschädigter Zellmembran. Im Gegensatz dazu penetriert der andere Fluoreszenzfarbstoff (Propidium-Iodid), der rot fluoresziert und ebenfalls an die DNA bindet, nur Bakterien mit beschädigter Zellmembran. Dies führt dann zu einer Reduktion der Fluoreszenz von SYTO 9, wenn beide Farbstoffe gleichzeitig an die DNA einer Zelle binden. Im Fluoreszenzmikroskop konnten also lebende Zellen (Bakterien mit einer intakten Zellmembran), die grün fluoreszierten, von toten Zellen (Bakterien mit einer defekten Zellmembran), die rot fluoreszierten, direkt voneinander unterschieden werden.

Mit dieser Anfärbemethode fluoreszierten die *P. aeruginosa* Zellen, die mit 20 mM Pyruvat unter anaeroben Bedingungen kultiviert worden waren, während der ganzen 17 Tage grün. Das bedeutet, dass alle beobachteten *P. aeruginosa* Zellen während der gesamten Zeitspanne von 17 Tagen eine intakte Zellmembran aufwiesen. Dies unterstützt die Ergebnisse, die mit der CFU-Methode auf aerob inkubierten LB-Agarplatten erhalten wurden. Im Gegensatz dazu wurde der Anteil rot fluoreszierender *P. aeruginosa* Zellen in dem Ansatz, welcher ohne Zusatz von Pyruvat unter anaeroben Bedingungen inkubiert worden waren, immer höher, jedoch nie über 10 %. Offensichtlich wurde die durch den Fluoreszenzfarbstoff anfärbbare DNA nach dem Zelltod entsprechend schnell abgebaut.

3.3.2.3 Resümee zu den unterschiedlichen Methoden der Zellzahlbestimmung

In Anwesenheit von 20 mM Pyruvat während der anaeroben Inkubation bleibt die *P. aeruginosa*-Zellzahl über 17 Tage konstant. Die drei verschiedenen Methoden zur Bestimmung der Zellzahl ergeben während dieser Zeitdauer einheitliche Ergebnisse. Wenn aber das gesamte Pyruvat verbraucht ist und die anaerobe Hunger-Phase eintritt, dann fällt die Zahl der aerob auf LB-Agarplatten kultivierbaren Zellen (CFU) drastisch ab (Abb. 11). Gleichzeitig treten nun lebendige, jedoch aerob nicht mehr kultivierbare Zellen auf, was durch

Anfärben mit speziellen Fluoreszenzfarbstoffen nachgewiesen werden konnte. Ab diesem Zeitpunkt ergeben die drei verwendeten Methoden zur Zellzahl-Bestimmung voneinander abweichende Messwerte. Das „anaerobe Überleben“ wurde daher in dieser Arbeit als diejenige Periode definiert, in welcher eine konstante Anzahl aerob kultivierbarer Zellen (CFU auf LB-Agarplatten) vorhanden ist.

Auf einen wesentlichen Unterschied zwischen *P. aeruginosa* und *E. coli* soll hier nochmals hingewiesen werden: *E. coli* kann durch fermentativen Glucose-Abbau wachsen, *P. aeruginosa* bei Anwesenheit von Pyruvat nur überleben. Denn im Gegensatz zu *E. coli*, bei dem unter fermentativen Bedingungen ein oxidativer Abbau von Glucose zu Pyruvat bei gleichzeitiger Reduktion von NAD^+ zu NADH (Böck & Sawers, 1996) stattfindet, konnten diese Schritte bei den Experimenten mit *P. aeruginosa* nicht nachgewiesen werden. Dies kann nicht allein auf den unterschiedlichen Glucose-Metabolismus dieser beiden Gram-negativen Bakterien zurückgeführt werden (siehe 1.3.1). Möglicherweise wird durch die Oxidation von Glucose oder Gluconat zu Pyruvat in *P. aeruginosa* zuviel NADH gebildet, welches im fermentativen Modus nicht mehr vollständig zu NAD^+ regeneriert werden kann. Diese Erklärung wird durch die Beobachtung unterstützt, dass unter den hier getesteten Bedingungen keine nachweisbaren Mengen an Ethanol gebildet wurden. Denn gerade die Reduktion von Acetyl-CoA über Acetaldehyd zu Ethanol ermöglicht es, dass große Mengen von NAD^+ regeneriert werden können (2 mol NAD^+ pro mol Ethanol).

3.3.3 Fermentation von Pyruvat durch *Pseudomonas aeruginosa* im anaeroben Milieu

Pyruvat ist essentiell für das lang anhaltende Überleben von *P. aeruginosa* unter anaeroben Bedingungen ohne externe Elektronenakzeptoren. Die Grundlage dafür könnte entweder eine mögliche Fermentation von Pyruvat oder ein anderer unbekannter (indirekter) Mechanismus sein.

3.3.3.1 HPLC-Analysen der Fermentationsprodukte in Kulturüberständen

Um nach möglichen Metaboliten eines Pyruvat-Umsatzes zu suchen, wurden HPLC-Analysen von den Kulturüberständen in bestimmten Zeitintervallen durchgeführt, wie unter 2.10 beschrieben. Durch Vergleich mit geeigneten Eichsubstanzen konnten Lactat, Acetat und Succinat als Fermentationsprodukte von Pyruvat in *P. aeruginosa* nachgewiesen werden.

In Abb. 12 ist ein Beispiel zweier Chromatogramme mit dem über die Zeit aufgetragenen Brechungsindex (RI-Detektor) dargestellt. Die beiden Chromatogramme sind von HPLC-Analysen der Kulturüberstände des gleichen *P. aeruginosa*-Inkubationsversuches, wobei Proben zu unterschiedlichen Zeitpunkten entnommen worden sind. Abb. 12 a zeigt das Referenz-Chromatogramm zum Startpunkt der fermentativen Inkubation (Referenzprobe, $t = 0$) und in Abb. 12 b ist das entsprechende Chromatogramm einer Probe nach 22 Tagen dargestellt.

Durch Vergleich mit Eichsubstanzen konnten die Signale Pyruvat (Nr. 4 in Abb. 12), Lactat (Nr. 7 in Abb. 12), Acetat (Nr. 6 in Abb. 12) und Succinat (Nr. 5 in Abb. 12) zugeordnet werden. Der 100 mM Phosphat-Puffer resultierte in dem prominentesten Peak (Nr. 3 in Abb. 12). Außer diesen konnten keine weiteren Peaks in dem HPLC-Chromatogramm des Brechungsindex identifiziert werden, die nicht schon in der Referenzanalyse vorhanden waren und auf zusätzliche Metaboliten der Pyruvat-Fermentation hindeuten würden (Abb. 12). Auch der Photodiodenarray-Detektor zeigte deutliche Absorptionen (A_{\max} bei < 200 nm) für Pyruvat, Lactat, Acetat und Succinat und sonst keine weiteren von der Referenzprobe abweichenden Signale an.

Auch bei verschiedenen Kombinationen von anderen Substraten mit Pyruvat, wie z.B. Glucose mit Pyruvat oder Gluconat und Pyruvat, wurden keine weiteren Metaboliten identifiziert. Damit konnten neben verschiedenen organischen Säuren, wie z.B. Formiat, Propionat und Butyrat, auch diverse Alkohole, wie z.B. Ethanol, Propanol und Butan-1,2-diol, als Pyruvat-Fermentationsprodukte in *P. aeruginosa* unter den hier getesteten Bedingungen ausgeschlossen werden.

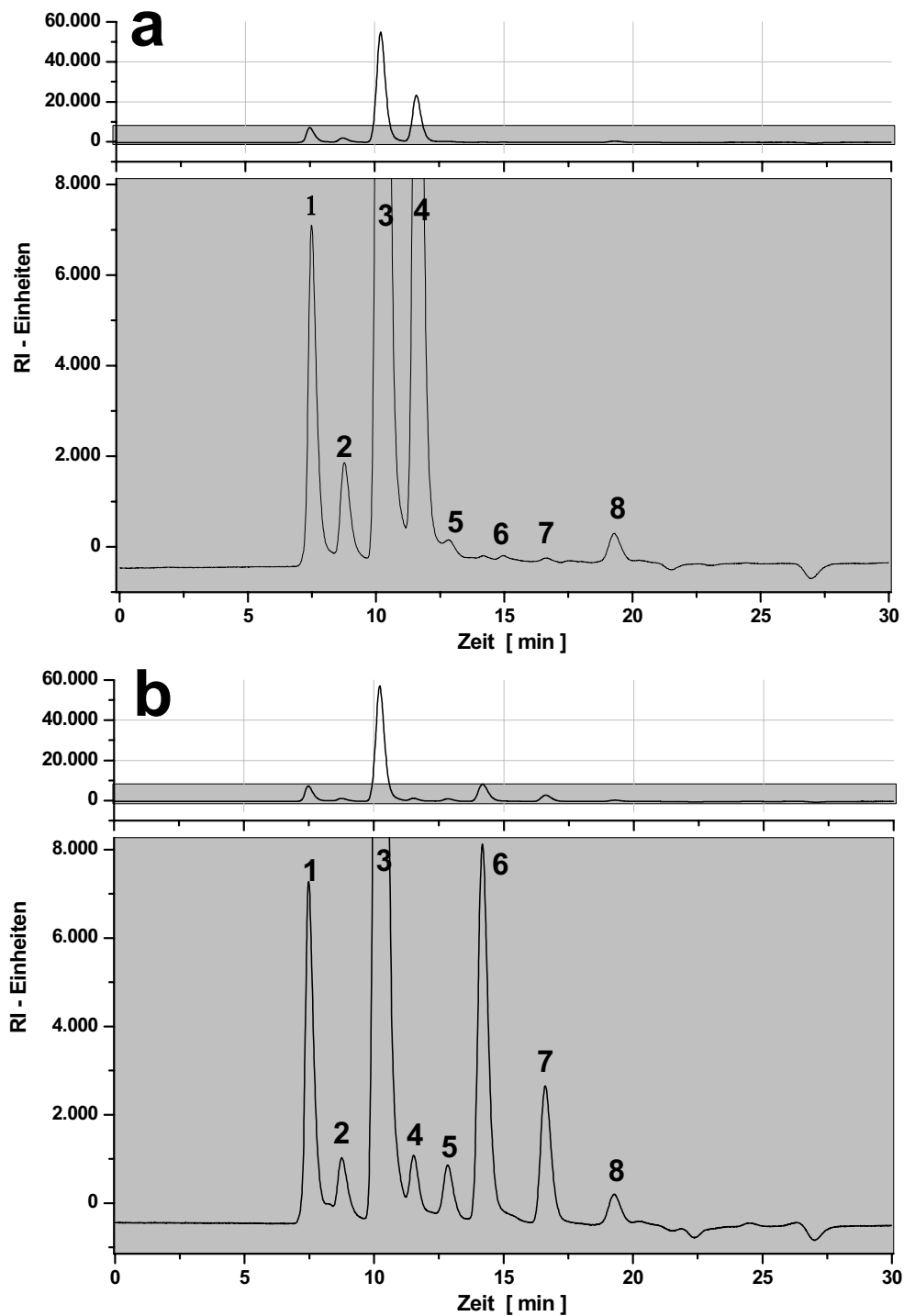


Abb. 12 Ergebnis der HPLC-Analyse von Fermentationsprodukten aus Kulturüberständen einer Pyruvat-fermentierenden *P. aeruginosa*-Kultur.

(a) Die analysierte Probe war der Kulturüberstand von *P. aeruginosa*, welcher 10 Minuten mit 20 mM Pyruvat anaerob inkubiert wurde (Referenzprobe). Oben ist ein Chromatogramm des RI-Detektors (Brechungsindex) und unten ein vergrößerter Ausschnitt daraus dargestellt. (b) Die analysierte Probe war Kulturüberstand von *P. aeruginosa*, welcher 22 Tage mit 20 mM Pyruvat anaerob inkubiert wurde. Oben ist ein Chromatogramm des RI-Detektors (Brechungsindex) und unten ein vergrößerter Ausschnitt daraus dargestellt. 1 – Säulendurchlauf, 2 – unbekannter Peak; 3 – Phosphatpuffer; 4 – Pyruvat; 5 – Succinat; 6 – Acetat; 7 – Lactat, 8 – unbekannter Peak. Es zeigte sich eine deutliche Abnahme der Pyruvat-Konzentration (4) bei gleichzeitiger Bildung von Succinat (5), Acetat (6) und Lactat (7).

Um einen kinetischen Verlauf der Abnahme der Pyruvat-Konzentration und der Zunahme der Fermentationsprodukt-Konzentrationen zu erhalten, wurden HPLC-Analysen über insgesamt 22 Tage mit einem zeitlichen Intervall von etwa 24 Stunden durchgeführt. Die Peaks der einzelnen Chromatogramme wurden von der HPLC-Software „Borwin“ (Jasco) integriert und die Peakflächen durch Vergleich mit den entsprechenden Eichsubstanzen in Konzentrationen (mM) umgerechnet. Die erhaltenen Konzentrationen sind in Abb. 13 gegen die Zeit aufgetragen.

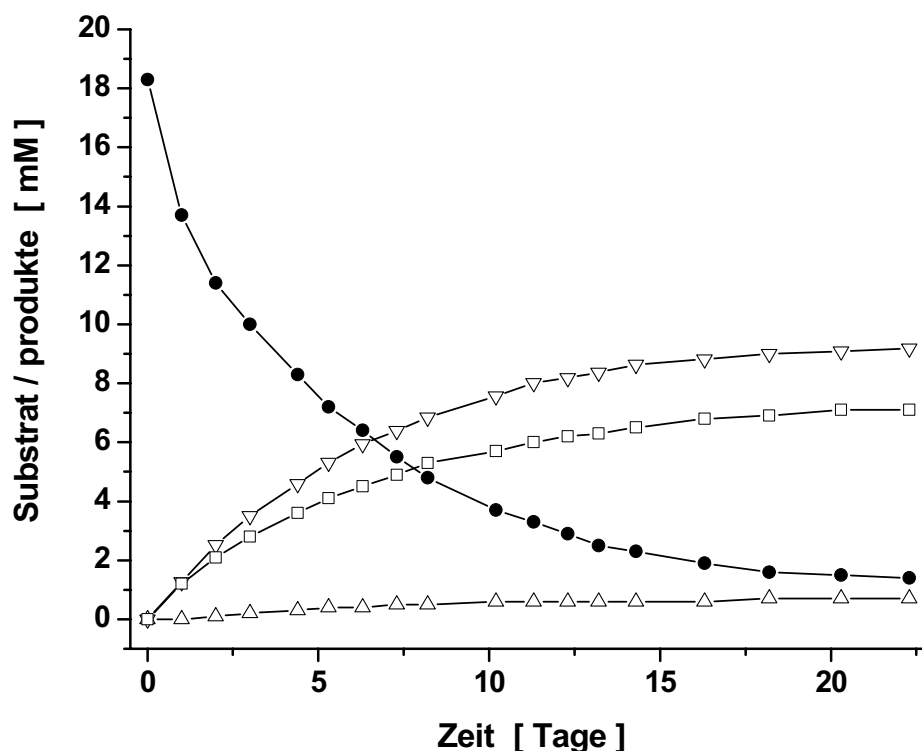


Abb. 13 Zeitliche Abhängigkeit des Verbrauchs von Pyruvat und der Bildung von Fermentationsprodukten, welche durch HPLC-Analysen von Kulturüberständen von *P. aeruginosa* Wildtyp bestimmt wurden.

P. aeruginosa wurde dazu in Minimalmedium mit 20 mM Pyruvat im anaeroben Milieu 22 Tage kultiviert. Es wurden zu den angegebenen Zeiten steril Proben entnommen und die Kulturüberstände mit HPLC analysiert. Es zeigte sich eine Abnahme der Pyruvat-Konzentration (-●-) bei gleichzeitiger Zunahme der Konzentrationen von Lactat (-▽-), Acetat (-□-) und Succinat (-△-) im Medium.

3.3.3.2 Vergleich der Fermentationsbilanzen mit den Lebendzellzahlen

Die Kurve der CFU (siehe -■- in Abb. 11) zeigt nach dem fast kompletten Umsatz von Pyruvat zu den entsprechenden Fermentationsprodukten nach ungefähr 18 Tagen (siehe Abb. 13) den gleichen logarithmischen Abfall der Lebendzellzahl wie die Kurve für *P. aeruginosa* in einem Medium ohne Pyruvat vom ersten Tag der anaeroben Inkubation an (siehe -□- in Abb. 11). Dies unterstreicht eindrucksvoll, dass durch die Fermentation von Pyruvat *P. aeruginosa* mit ausreichender Energie (in Form von ATP) und Redox-Äquivalenten (in Form von regeneriertem NAD^+) versorgt wird, um die Zellzahl unter anaeroben Bedingungen konstant halten zu können. Nach einem Tag der anaeroben Inkubation konnten nur die Hälfte (bezogen auf die molaren Verhältnisse) des bis dahin verbrauchten Pyruvates in Form von Lactat und Acetat im Medium wieder gefunden werden (siehe Tab. 7). Aber nach ungefähr 18 Tagen, als keine weitere signifikante Abnahme der Pyruvat-Konzentration mehr festgestellt werden konnte, waren ungefähr 17 mM Pyruvat von *P. aeruginosa* quantitativ in die Fermentationsprodukte Lactat, Acetat und Succinat mit den entsprechenden molaren Verhältnissen von 0.54 : 0.42 : 0.04 überführt worden (siehe Tab. 7). Möglicherweise müssen die aus Pyruvat entstehenden Fermentationsprodukte zuerst eine gewisse Konzentration innerhalb der Zelle erreichen, bevor sie ins Medium ausgeschieden werden. Daher würde am Anfang der anaeroben Inkubation die Pyruvat-Konzentration im Kulturüberstand stärker abnehmen als die Konzentration der Fermentationsprodukte zunimmt.

Tab. 7 Bilanz der Pyruvat-Fermentation in *P. aeruginosa*.

Die mit Hilfe der HPLC-Analyse gewonnenen Konzentrationen von Lactat, Acetat und Succinat im Fermentationsmedium (siehe Abb. 13) wurden ins molare Verhältnis mit der Konzentrationsabnahme des verbrauchten Pyruvats gesetzt.

Zeitpunkt der Probenahme (Tage)	Verbrauchtes Pyruvat (mM)	Gebildete Fermentationsprodukte						
		Konzentration (mM)			Verhältnis (mol/mol Pyruvat)			
		Lactat	Acetat	Succinat	Lactat	Acetat	Succinat	Gesamt
1.0	4.6	1.2	1.2	0.0	0.26	0.26	0.00	0.52
2.0	6.9	2.5	2.1	0.1	0.36	0.30	0.01	0.68
3.0	8.3	3.5	2.8	0.2	0.42	0.34	0.02	0.78
4.4	10.0	4.6	3.6	0.3	0.46	0.36	0.03	0.85
5.3	11.1	5.3	4.1	0.4	0.48	0.37	0.04	0.88
6.3	11.9	5.9	4.5	0.4	0.50	0.38	0.03	0.91
7.3	12.8	6.4	4.9	0.5	0.50	0.38	0.04	0.92
8.2	13.5	6.8	5.3	0.5	0.50	0.39	0.04	0.93
10.2	14.6	7.6	5.7	0.6	0.52	0.39	0.04	0.95
11.3	15.0	8.0	6.0	0.6	0.53	0.40	0.04	0.97
12.3	15.4	8.2	6.2	0.6	0.53	0.40	0.04	0.97
13.2	15.8	8.4	6.3	0.6	0.53	0.40	0.04	0.97
14.3	16.0	8.6	6.5	0.6	0.54	0.41	0.04	0.98
16.3	16.4	8.8	6.8	0.6	0.54	0.41	0.04	0.99
18.2	16.7	9.0	6.9	0.7	0.54	0.41	0.04	0.99
20.3	16.8	9.1	7.1	0.7	0.54	0.42	0.04	1.00
22.3	16.9	9.2	7.1	0.7	0.54	0.42	0.04	1.00

Zusammenfassend lässt sich aus diesen Experimenten ableiten, dass Pyruvat von *P. aeruginosa* unter den hier untersuchten fermentativen Bedingungen nicht als C-Quelle genutzt wird. Dies ist auch in guter Übereinstimmung mit der ursprünglichen Beobachtung, dass *P. aeruginosa* unter anaeroben Bedingungen mit Pyruvat nicht in der Lage ist zu wachsen.

Selbst in *E. coli*, der eine vergleichsweise effektive Fermentation besitzt, können nur maximal 10 % der aufgenommenen Substratmenge für die Nutzung als C-Quelle abgezweigt werden (Böck & Sawers, 1996). Der überwiegende Teil wird zur Regenerierung von NAD^+ und ATP über Substratkettenphosphorylierung benötigt und muss in Form von reduzierten, energiereichen Fermentationsprodukten wieder ausgeschieden werden.

3.3.3.3 Weitere Kohlenstoff-Quellen

Die von Kerstin Schreiber im Rahmen ihrer Diplomarbeit in unserem Labor durchgeführten Kontrollexperimente in M9-Minimalmedium lieferten keine anderen C-Komponenten, welche essentiell für ein anaerobes Überleben von *P. aeruginosa* sein können (Schreiber, 2003). Es wurde weiterhin überprüft, inwieweit die Fermentation von Arginin (siehe 1.3.2.2; Mercenier *et al.*, 1980), welches durch die Degradation von intrazellulärem Protein entsteht, zum anaeroben Überleben von *P. aeruginosa* beiträgt. Weder die Menge an intrazellulärem Arginin noch das im LB-Vollmedium bereits enthaltene Arginin war ausreichend, um die Lebendzellzahl unter den getesteten Bedingungen konstant zu halten (Schreiber, 2003). Diese Experimente schlossen daher eine gleichzeitig ablaufende Arginin-Fermentation als einen signifikanten Beitrag zum beobachteten Phänomen des Überlebens von *P. aeruginosa* unter Pyruvat-fermentierenden Bedingungen aus.

Obwohl *P. aeruginosa* theoretisch NAD^+ auch durch eine anaerob induzierbare Alkohol-Dehydrogenase (PA5427) regenerieren können müsste, wird dieser Stoffwechselweg nicht unter den hier untersuchten Bedingungen benutzt (siehe Abb. 13).

3.3.3.4 Kinetik der Pyruvat-Umsetzung

Es stellt sich die Frage, warum im Gegensatz zu *E. coli* die Pyruvat-Umsetzung in *P. aeruginosa* so langsam ist. Bei einer Zelldichte von ungefähr $5 \cdot 10^8$ Zellen / ml werden nur annähernd 1 mM Pyruvat am Tag benötigt und ein Wachstum findet nicht statt. Von MacGregor *et al.* (1992) konnte gezeigt werden, dass Pyruvat selbst im aeroben Milieu kein bevorzugtes Substrat für *P. aeruginosa* ist. Das Bakterium wächst nur sehr schlecht in einem aeroben Minimalmedium mit Pyruvat als alleiniger Kohlenstoff-Quelle. Es wurde nachgewiesen, dass zwar bei *E. coli* aber nicht bei *P. aeruginosa* ein aktiver Transport von Pyruvat durch die Membran stattfindet (Matin & Konings, 1973). Glucose wird im Gegensatz dazu von *P. aeruginosa* sehr effektiv aufgenommen und aerob zur Energiegewinnung genutzt. Da aber Glucose anaerob von *P. aeruginosa* nicht fermentiert werden kann, wie die Experimente in 3.3.1 gezeigt haben, bleibt nur die Verwertung von Pyruvat trotz der sehr langsamen Aufnahme in das Zellinnere.

3.3.4 Die Beteiligung der Genloci *gacS-ldhA* und *ackA-pta* an der Pyruvat-Fermentation in *Pseudomonas aeruginosa*

Zwei Genloci auf dem Chromosom von *P. aeruginosa* wurden auf ihre möglichen Beteiligung am fermentativen Metabolismus untersucht: Der ORF *ldhA*, welcher für eine potentielle fermentative Lactat-Dehydrogenase kodiert, und die beiden ORFs *ackA-pta*, welche für eine potentielle Acetat-Kinase und Phosphotransacetylase kodieren.

3.3.4.1 Herstellung von *Pseudomonas aeruginosa* – Mutanten in potentiellen Genen der Pyruvat-Fermentation

Zuerst wurden die entsprechenden Gene, *pta* und *ldhA*, auf dem *P. aeruginosa*-Chromosom durch homologe Rekombination mit zuvor gentechnisch konstruierten Plasmiden ausgeschaltet.

3.3.4.1.1 Konstruktion der *pta*- Mutanten PAO-ME1

Bei der Konstruktion der *double-cross-over* Mutanten im *pta*-Gen wurde vorgegangen, wie unter 2.7.2.1 beschrieben. Zunächst wurde mit Hilfe der PCR ein 2149 bp großes Fragment, welches eine 348 lange Sequenz stromabwärts des *pta*-Stopkodons sowie 1801 bp des Gens *pta* selbst enthält, aus der chromosomalen DNA von *P. aeruginosa* amplifiziert. Das mit *Bam*HI und *Hind*III geschnittene PCR-Produkt wurde mit dem an der MCS durch die gleichen Enzyme geöffneten Vektor pEX18Ap ligiert. An den beiden natürlich vorhandenen *Sal*I-Schnittstellen in der *pta*-Gensequenz des entstandenen Konstrukts pMEP1 wurde mit der Restriktionsendonuklease *Sal*I geschnitten, wodurch eine 288 bp lange Sequenz (Nukleotide 1482 - 1770 vom *pta*-Gen) deletiert wurde. Der linearisierte Vektor pMEP1 wurde mit einer Gm-Resistenzkassette über zwei *Sal*I-Schnittstellen ligiert und dadurch wieder geschlossen. Der entstandene ‚*gene replacement*‘-Vektor pMEP2 wurde zuerst in *E. coli* SM10 transformiert (2.6.7.1). Da dieser Stamm alle Gene für eine Mobilisierung des Plasmids besitzt, kann er zum Übertragen des Plasmids mittels *diparental mating* in *P. aeruginosa* genutzt werden. Nach der Regeneration wurden die transformierten *E. coli* SM10 Zellen auf LB-Agarplatten mit 10 µg/ml Gentamycin ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Das *diparental mating* von *E. coli* SM10 mit *P. aeruginosa* wurde durchgeführt, wie unter 2.6.7.2 beschrieben. Da das Plasmid pMEP2 in *P. aeruginosa* nicht frei replizierbar ist (*suicide*-Vektor), überleben unter Gentamycin-Antibiotikaselektion nur diejenigen Zellen,

welche die Gm-Resistenzkassette über *single-cross-over* ins Chromosom integrieren konnten (siehe 1. Schritt in Abb. 14).

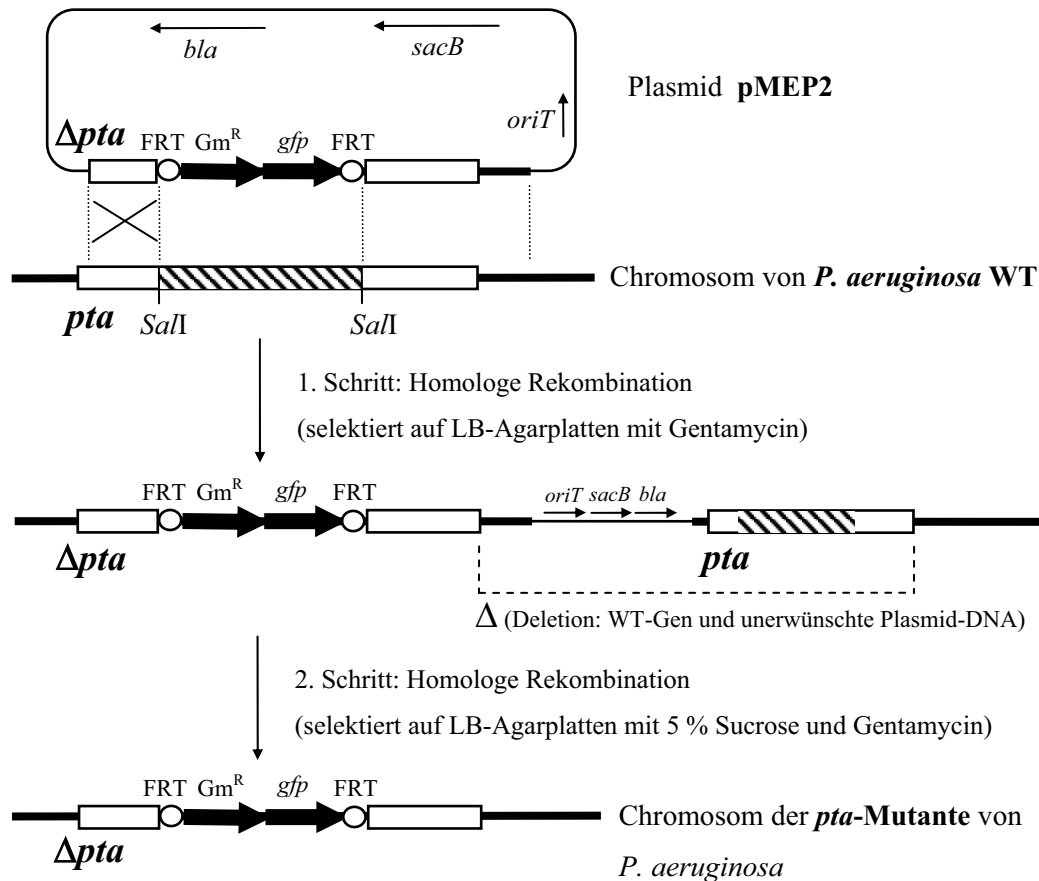


Abb. 14 Schema der Doppelrekombination zwischen dem Plasmid pMEP2 und dem *P. aeruginosa*-Chromosom, welche zum Knockout des Gens *pta* führt (modifiziert nach Hoang *et al.*, 1998).

Nach dem 1. Schritt der homologen Rekombination, auf den durch Kultivierung auf LB-Agarplatten mit Gentamycin selektiert wurde, ist der *suicide*-Vektor pMEP2 in das *P. aeruginosa*-Chromosom integriert worden. Die erhaltenen Zellen wurden anschließend im 2. Schritt auf LB-Agarplatten mit Gentamycin und Sucrose ausgestrichen, um auf chromosomale *pta*-Mutanten von *P. aeruginosa* zu selektieren. Das Genprodukt von *sacB* bildet aus Sucrose ein für *P. aeruginosa* toxisches Produkt. Deshalb können nur diejenigen Zellen wachsen, bei denen das *sacB*-Gen mit der gesamten unerwünschten Plasmid-DNA und dem *pta*-WT-Gen durch eine 2. homologe Rekombination aus dem Chromosom deletiert worden ist. Das Ergebnis dieser Doppelrekombination ist, dass die Nukleotide 1482 - 1770 (schraffierter DNA-Bereich) des *pta*-Gens im *P. aeruginosa* WT durch die DNA-Kassette FRT-Gm^R-*gfp*-FRT in der *pta*-Mutante ersetzt wurden.

FRT – Bindestelle für die FLP-Rekombinase; Gm^R – Gentamycin-Resistenzkassette; *gfp* – kodiert für *green fluorescent protein*; *pta* – kodiert für Phosphotransacetylase; *sacB* – kodiert für Levansucrase; *bla* – kodiert für β-Lactamase; *oriT* – *origin of transfer*.

Um die nicht erwünschte Plasmid-DNA wieder aus dem Chromosom zu deletieren, wurde die Eigenschaft des *sacB*-Gens ausgenutzt, aus Sucrose ein für *P. aeruginosa* toxisches Polymer zu bilden. Durch viermaliges fraktioniertes Ausplattieren von Einzelkolonien auf LB-Agarplatten mit 200 µg/ml Gentamycin und 5 % Sucrose wurde daher auf diejenigen Zellen selektiert, bei denen ein *double-cross-over* stattgefunden hat (siehe 2. Schritt in Abb. 14). Der gesamte Ablauf der *cross-over*-Ereignisse bei der Herstellung der *P. aeruginosa pta*-Mutante ist in Abb. 14 schematisch dargestellt.

Die Gentamycin-resistenten und Carbenicillin-sensitiven Kolonien wurden mittels Kolonie-PCR nochmals verifiziert und konnten als *pta*-Deletionsmutanten mit richtig insertierter Gm-Kassette identifiziert werden, wie unter 2.7.2.1 beschrieben.

3.3.4.1.2 Konstruktion der *ldhA*- Mutanten PAO-ME3

Für die Konstruktion der *ldhA*-Mutante PAO-ME3 wurde eine analoge Strategie wie für den mutierten *pta*-Locus benutzt. Sie führte zur Deletion eines 726 bp langen DNA-Fragmentes aus dem *ldhA*-Gen (Nukleotide 102 - 828) an den beiden natürlich vorhandenen *SdaI*-Schnittstellen bei gleichzeitiger Insertion einer Gentamycin-Resistenzkassette. Die experimentellen Details sind unter 2.7.2.2 beschrieben. Der gesamte Ablauf der *cross-over*-Ereignisse bei der Herstellung der *P. aeruginosa ldhA*-Mutante ist in Abb. 15 schematisch dargestellt.

Die Gentamycin-resistenten und Carbenicillin-sensitiven Kolonien wurden mittels Kolonie-PCR nochmals verifiziert und konnten als *ldhA*-Deletionsmutanten mit richtig insertierter Gm-Kassette identifiziert werden, wie unter 2.7.2.2 beschrieben.

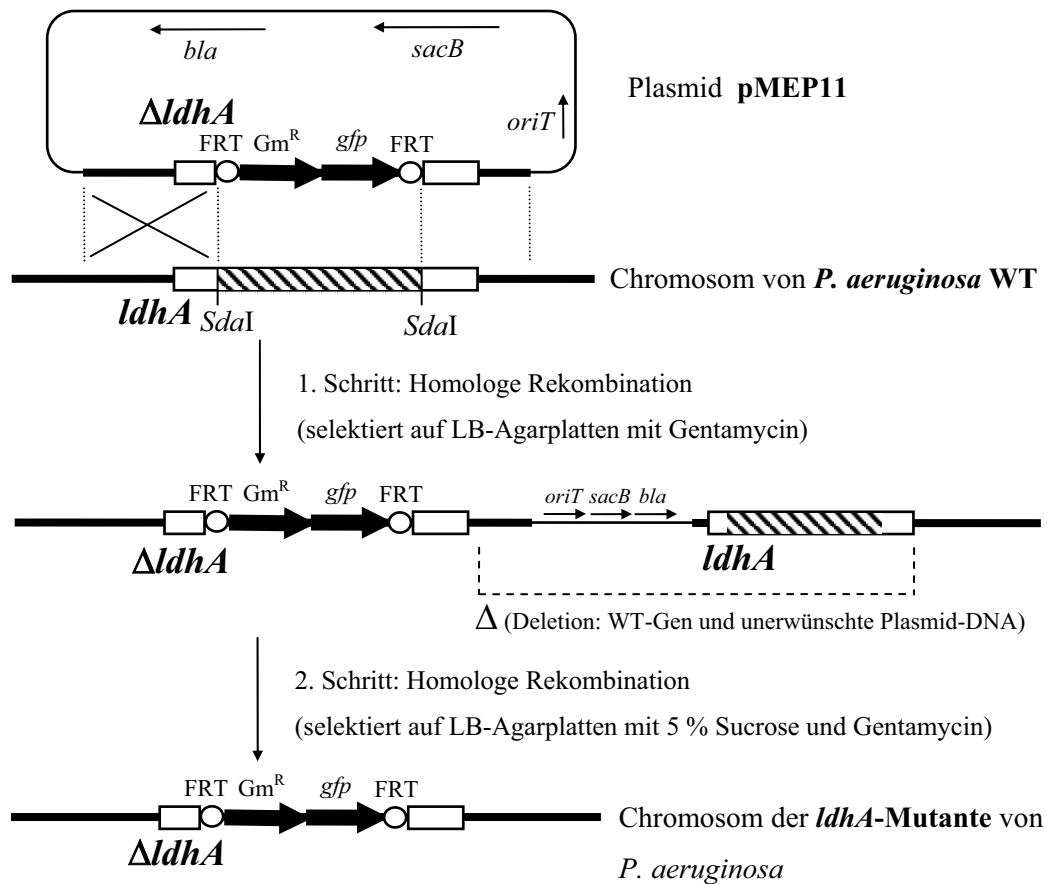


Abb. 15 Schema der Doppelrekombination zwischen dem Plasmid pMEP11 und dem *P. aeruginosa*-Chromosom, welche zum Knockout des Gens *ldhA* führt (modifiziert nach Hoang *et al.*, 1998).

Nach dem 1. Schritt der homologen Rekombination, auf den durch Kultivierung auf LB-Agarplatten mit Gentamycin selektiert wurde, ist der *suicide*-Vektor pMEP11 in das *P. aeruginosa*-Chromosom integriert worden. Die erhaltenen Zellen wurden anschließend im 2. Schritt auf LB-Agarplatten mit Gentamycin und Sucrose ausgestrichen, um auf chromosomale *ldhA*-Mutanten von *P. aeruginosa* zu selektieren. Das Genprodukt von *sacB* bildet aus Sucrose ein für *P. aeruginosa* toxisches Produkt. Deshalb können nur diejenigen Zellen wachsen, bei denen das *sacB*-Gen mit der gesamten unerwünschten Plasmid-DNA und dem *ldhA*-WT-Gen durch eine 2. homologe Rekombination aus dem Chromosom deletiert worden ist. Das Ergebnis dieser Doppelrekombination ist, dass die Nukleotide 102 - 828 (schraffierter DNA-Bereich) des *ldhA*-Gens im *P. aeruginosa* WT durch die DNA-Kassette FRT-*Gm^R*-*gfp*-FRT in der *ldhA*-Mutante ersetzt wurden.

FRT – Bindestelle für die FLP-Rekombinase; *Gm^R* – Gentamycin-Resistenzkassette; *gfp* – kodiert für *green fluorescent protein*; *ldhA* – kodiert für die NAD⁺-abhängige Lactat-Dehydrogenase; *sacB* – kodiert für Levansucrase; *bla* – kodiert für β -Lactamase; *oriT* – *origin of transfer*.

3.3.4.2 Wachstumsverhalten der *pta*- und *ldhA*- Mutanten unter fermentativen Bedingungen

Die beiden neu konstruierten Mutanten PAO-ME1 (Δpta) und PAO-ME3 ($\Delta ldhA$) wurden aerob in OS-Minimalmedium kultiviert, zentrifugiert und die Zellsedimente gewaschen. Anschließend wurden diese sofort in OS-Medium mit 2.5 g/l Hefeextrakt suspendiert und bei einer OD_{578} von ungefähr 0.25 unter anaeroben Bedingungen mit Pyruvat inkubiert, wie schon für den *P. aeruginosa* Wildtyp beschrieben. Die Zellzahlen (CFU auf LB-Agarplatten) sowohl der *pta*- als auch der *ldhA*-Mutante fielen schon nach ungefähr 5 Tagen anaerober Inkubation stark ab (siehe Abb. 16).

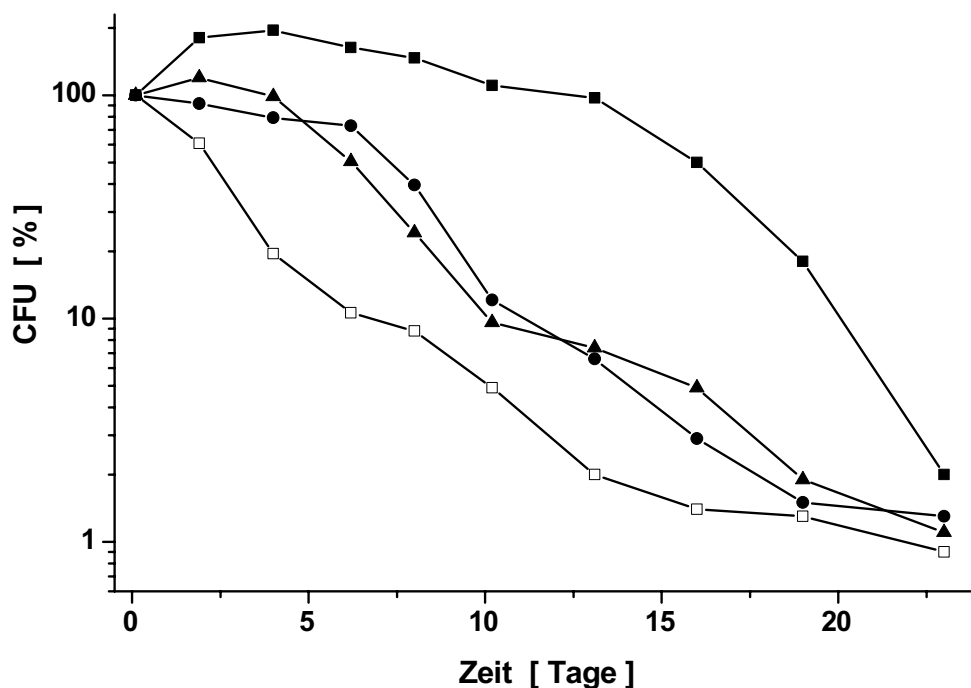


Abb. 16 Vergleich der Lebendzellzahl in CFU von *P. aeruginosa* Wildtyp, der *pta*- und der *ldhA*-Mutante, welche unter anaeroben Bedingungen mit Pyruvat inkubiert wurden.

Die Anfangswerte der bestimmten CFUs (eine Stunde nach Beginn der anaeroben Inkubation) sind zum besseren Vergleich auf 100 % gesetzt worden. 100 % entsprechen bei *P. aeruginosa* Wildtyp mit Pyruvat (-■-) $4.4 \cdot 10^8$ Zellen / ml und ohne Pyruvat (-□-) $4.3 \cdot 10^8$ Zellen / ml, bei der *pta*-Mutante mit Pyruvat (-●-) $4.0 \cdot 10^8$ Zellen / ml und bei der *ldhA*-Mutante mit Pyruvat (-▲-) $4.2 \cdot 10^8$ Zellen / ml. Es ist eine deutlich verringerte Überlebensrate der beiden untersuchten Mutanten im Vergleich zum *P. aeruginosa* Wildtyp zu erkennen.

Die HPLC-Analysen von Kulturüberständen der *ldhA*-Mutante zeigten weder eine signifikante Abnahme von Pyruvat noch die Bildung von Lactat, Acetat, Succinat oder anderen Fermentationsprodukten (Abb. 17 a).

In den Kulturüberständen der *pta*-Mutante konnte dagegen eine kleine Abnahme der Konzentration von Pyruvat und auch geringe Konzentrationszunahmen von Lactat (2 mM), Acetat (1 mM) und Succinat nachgewiesen werden (Abb. 17 b).

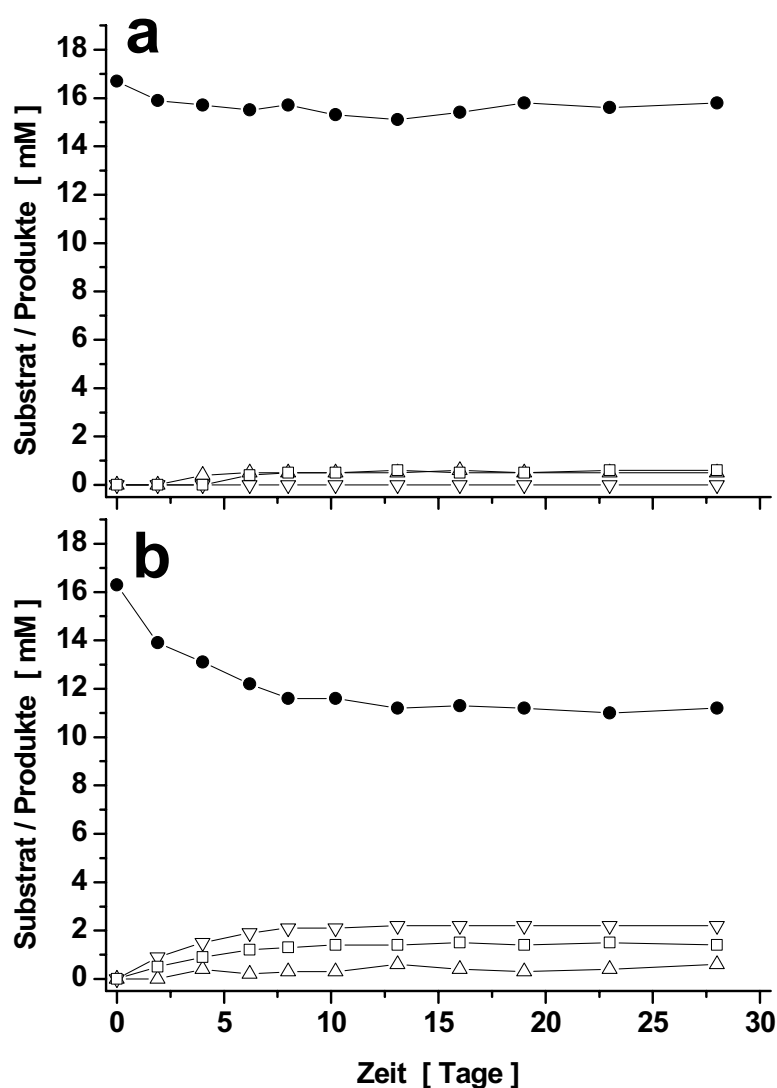


Abb. 17 Analyse der Pyruvat-Fermentation der *P. aeruginosa* *ldhA*-Mutante (a) und der *pta*-Mutante (b) mittels Bestimmung der Fermentationsprodukte in Kulturüberständen durch HPLC.

Die Bakterien wurden in Minimalmedium mit 20 mM Pyruvat im anaeroben Milieu 28 Tage kultiviert. Zu den angegebenen Zeiten wurden steril Proben entnommen und die Kulturüberstände mit HPLC analysiert. Konzentrationen von Pyruvat (—●—), Lactat (---▽---), Acetat (—□—) und Succinat (---△---) im Medium. Während bei der *ldhA*-Mutante weder eine signifikante Abnahme von Pyruvat noch die Bildung von Lactat, Acetat oder Succinat erfolgte (a), konnte bei der *pta*-Mutante ein kleiner Umsatz von Pyruvat in die Produkte Lactat, Acetat und Succinat nachgewiesen werden (b).

Zuerst war die zwar sehr geringe, aber doch messbare Konzentrationszunahme an Acetat (1 mM nach 6 Tagen) in der *pta*-Mutante erstaunlich. Doch in dieser Mutante ist nur das Enzym Phosphotransacetylase (Pta), welche die Reaktion zwischen Acetyl-CoA und Acetyl-Phosphat katalysiert, nicht funktionsfähig. Der zweite Teilschritt von Acetyl-Phosphat zu Acetat durch die Acetat-Kinase ist weiterhin vorhanden. Somit wäre es möglich, dass ein anderes Phosphatgruppen-übertragendes Enzym mit einer anderen Substratspezifität für den geringen Umsatz des ersten Teilschrittes in der *pta*-Mutante verantwortlich ist. Tatsächlich wurde eine geringe Restaktivität im zellfreien Proteinextrakt der *pta*-Mutante für diesen Reaktionsschritt mit Hilfe des Pta-Enzymtests festgestellt (siehe 3.3.4.3.2.3).

Eine weitere Erklärung für das beobachtete Phänomen in der *pta*-Mutante könnte die Aktivität der respirativen Pyruvat-Oxidase (PoxB) sein, welche Pyruvat direkt zu Acetat unter Abspaltung von Kohlendioxid oxidiert und die Elektronen in den Quinonpool einspeist (siehe Abb. 1 in Kap. 1.1.1; Gennis & Stewart, 1996). Ein dem *E. coli poxB*-Gen entsprechender Genlocus konnte in *P. aeruginosa* im Rahmen meiner Diplomarbeit nachgewiesen werden (Eschbach, 1999). Allerdings sind von diesem Enzym in *P. aeruginosa* noch keine experimentellen Daten vorhanden. Über eine Aktivität unter fermentativen Bedingungen kann daher nur spekuliert werden.

Die Enzyme Phosphotransacetylase (Pta) und Acetatkinase (AckA) wandeln Acetyl-CoA in Acetat um und bilden dabei ATP, während die fermentative Lactat-Dehydrogenase (LdhA) Pyruvat zu Lactat reduziert und dabei NAD^+ regeneriert. Mutanten, die in einem der zugehörigen Gene *pta* oder *ldhA* defekt sind, waren nicht mehr in der Lage, Pyruvat effektiv zu verwerten. Gleichzeitig nahm die Lebendzellzahl der Mutanten ab, vergleichbar zum *P. aeruginosa* Wildtyp, der ohne Pyruvat inkubiert worden war.

Durch diese Experimente konnte bestätigt werden, dass die untersuchten Genloci für Enzyme kodieren, welche essentiell für die Fermentation von Pyruvat zu Lactat, Acetat und Succinat in *P. aeruginosa* sind. Es wurde weiterhin nachgewiesen, dass im Gegensatz zu *E. coli* beide Wege gleichzeitig gebraucht werden.

3.3.4.3 Genexpression der fermentativen *Pseudomonas aeruginosa* -Loci *gacS-ldhA* und *pta-ackA*

Um die sauerstoffabhängige Expression des *gacS-ldhA*-Locus und des *ackA-pta*-Locus zu untersuchen, wurden zuerst die Daten der Microarray-Experimente ausgewertet, die von Katharina Trunk im Rahmen ihrer Doktorarbeit durchgeführt worden sind. Die daraus erhaltenen Ergebnisse wurden zusätzlich durch folgende davon unabhängige Methoden verifiziert:

- gentechnische Kopplung des zu untersuchenden Promotorbereiches an das Reportergen *lacZ* und Messung der β -Galaktosidaseaktivität
- direkte Messung der entsprechenden Enzymaktivität im zellfreien Extrakt

3.3.4.3.1 Der *ldhA*-Locus wird unabhängig vom Sauerstoffpartialdruck exprimiert

Es wurden Präparationen der Gesamt-RNA von in AB-Minimalmedium unter aeroben sowie unter anaeroben Bedingungen kultivierten *P. aeruginosa* Wildtypzellen hergestellt und auf DNA-Microarrays (Affymetrix, Santa Clara) miteinander verglichen, wie in Kap. 2.6.9 beschrieben (Trunk, 2004, Dissertation TU Braunschweig, in Vorbereitung). Die Kultivierung und die Präparation der Gesamt-RNA von den *P. aeruginosa anr*- und *dnr*-Mutanten erfolgte entsprechend dem Wildtyp.

Es konnte keine signifikante Änderung der Expression des *ldhA*-Locus im *P. aeruginosa* Wildtyp in Abhängigkeit vom Sauerstoffpartialdruck beobachtet werden (siehe Tab. 8).

Tab. 8 Anhand von DNA-Microarrays analysierte Expression des *ldhA*-Locus im *P. aeruginosa* Wildtyp sowie den *anr*- und *dnr*-Mutanten in Abhängigkeit vom Sauerstoffpartialdruck.

Aus aerob und anaerob kultivierten *P. aeruginosa* Wildtypzellen sowie den *anr*- und *dnr*-Mutanten wurde Gesamt-RNA extrahiert und auf DNA-Microarrays aufgebracht. Die Durchführung und Auswertung der Microarray-Experimente ist in 2.6.9 beschrieben.

Bakterienstamm	Menge an <i>ldhA</i> -mRNA ¹	
	aerobes Milieu	anaerobes Milieu
<i>P. aeruginosa</i>		
Wildtyp (PAO1)	3.6	2.8
<i>anr</i> -Mutante (PAO6261)	n.b. ²	2.9
<i>dnr</i> -Mutante (RM536)	n.b. ²	3.3

¹ Die mRNA-Menge ist in normalisierten Affymetrix-Einheiten angegeben.

² nicht bestimmt, da bekannt ist, dass sich die Aktivität der Regulatoren Anr und Dnr auf anaerobe Bedingungen beschränkt.

Auch bei den beiden Regulationsmutanten, bei denen entweder das *anr*- oder das *dnr*-Gen deletiert worden war (zur Funktion von Anr und Dnr siehe Einleitung 1.4.1), wurde keine Änderung der *ldhA*-mRNA-Menge im Vergleich zum *P. aeruginosa* Wildtyp festgestellt (Tab. 8).

Der NADH-abhängige LdhA-Enzymtest im zellfreien Extrakt führte zu keinem verwertbaren Ergebnis, da zu viele andere NADH-verbrauchende Enzyme im zellfreien Extrakt den Test störten. Weiterhin konnte das Genprodukt des *ldhA*-Locus nicht auf 2-D Gelen identifiziert werden und die *lacZ*-Messung einer Reporterfusion zeigte keine sauerstoffabhängige Expression.

3.3.4.3.2 Sauerstoffpartialdruck gesteuerte Expression des *ackA-pta* Genlocus

3.3.4.3.2.1 Bestimmung der Expression mittels DNA-Microarrays

Es wurden Präparationen der Gesamt-RNA von in AB-Minimalmedium unter aeroben sowie unter anaeroben Bedingungen kultivierten *P. aeruginosa* Wildtypzellen hergestellt und auf den DNA-Microarrays (Affymetrix, Santa Clara) miteinander verglichen, wie in Kap. 2.6.9 beschrieben (Trunk, 2004, Dissertation TU Braunschweig, in Vorbereitung). Die Kultivierung und die Präparation der Gesamt-RNA von den *P. aeruginosa anr*- und *dnr*-Mutanten erfolgte entsprechend dem Wildtyp.

Das *ackA*-Gen wurde im *P. aeruginosa* Wildtyp unter anaeroben Bedingungen 5.6-fach induziert verglichen zu aeroben Bedingungen (Tab. 9). In der *anr*-Mutante sank diese anaerobe Induktion auf das nur noch 2-fache ab. Die *dnr*-Mutante zeigte keine vom Wildtyp signifikant abweichende Regulation (5.9-fache Induktion unter anaeroben Bedingungen) der *ackA*-Genexpression (Tab. 9).

Das *pta*-Gen wurde im *P. aeruginosa* Wildtyp unter anaeroben Bedingungen 6.8-fach induziert verglichen zum aeroben Milieu (Tab. 9). In der *anr*-Mutante sank diese anaerobe Induktion der Genexpression auf das nur noch 2-fache ab. In der *dnr*-Mutante konnte sogar eine 10.4-fache Induktion der *ackA*-Genexpression unter anaeroben Bedingungen gemessen werden (Tab. 9).

Tab. 9 Anhand von DNA-Microarrays analysierte Expression des *ackA-pta*-Locus in *P. aeruginosa* Wildtyp sowie den *anr*- und *dnr*-Mutanten in Abhängigkeit vom Sauerstoffpartialdruck.

Aus aerob und anaerob kultivierten *P. aeruginosa* Wildtypzellen sowie den *anr*- und *dnr*-Mutanten wurde Gesamt-RNA extrahiert und auf DNA-Microarrays aufgebracht. Die Durchführung und Auswertung der Microarray-Experimente ist in 2.6.9 beschrieben.

analysierte mRNA	<i>P. aeruginosa</i> -Stamm	Menge an mRNA ¹	
		aerobes Milieu	anaerobes Milieu
<i>ackA</i> -mRNA	Wildtyp (PAO1)	25.6	143
	<i>anr</i> -Mutante (PAO6261)	n.b. ²	50.3
	<i>dnr</i> -Mutante (RM536)	n.b. ²	152
<i>pta</i> -mRNA	Wildtyp (PAO1)	13.4	90.8
	<i>anr</i> -Mutante (PAO6261)	n.b. ²	25.1
	<i>dnr</i> -Mutante (RM536)	n.b. ²	140

¹ Die mRNA-Menge ist in normalisierten Affymetrix-Einheiten angegeben.

² nicht bestimmt, da bekannt ist, dass sich die Aktivität der Regulatoren Anr und Dnr auf anaerobe Bedingungen beschränkt.

Anhand dieser DNA-Microarray-Experimente konnte gezeigt werden, dass die beiden Gene *ackA* und *pta* unter anaeroben Bedingungen im *P. aeruginosa* Wildtyp etwa 5-7 mal stärker exprimiert werden als unter aeroben Bedingungen. Diese Induktion ist in der *anr*-Mutante, nicht aber in der *dnr*-Mutante, bei beiden Genen fast vollständig aufgehoben. Da *ackA* und *pta* bei den Experimenten das gleiche Regulationsprofil aufweisen und zusätzlich auf dem Chromosom von *P. aeruginosa* direkt benachbart sind, kann davon ausgegangen werden, dass diese beiden Gene ein gemeinsames Operon bilden.

3.3.4.3.2.2 Bestimmung der Expression mittels Reportergenfusion

Von dem potentiellen Promotorbereich des Genlocus *ackA-pta* wurde eine Reportergenfusion mit dem *lacZ*-Gen auf dem frei-replizierbaren Plasmid pQF50 hergestellt, wie unter 2.7.1 beschrieben. Nachdem das konstruierte Plasmid packA mit Hilfe von Elektroporation in *P. aeruginosa* PAO1 sowie in die *anr*-, *dnr*-, IHF- und *narL*-Mutanten eingebracht worden war, wurden die Zellen grundsätzlich mit hohen Konzentrationen an Carbenicillin (500 µg/ml) im Medium kultiviert. Durch diesen Selektionsdruck sollte gewährleistet sein, dass die Bakterien das Plasmid mit der Antibiotika-Resistenzkassette nicht verlieren.

Die nachfolgend beschriebene Kultivierung der Zellen mit dem Reportergen-Konstrukt und die Bestimmung der β -Galaktosidaseaktivitäten wurden in Zusammenarbeit mit Kerstin Schreiber durchgeführt. Die Zellen wurden in LB-Medium mit 500 $\mu\text{g/ml}$ Carbenicillin unter aeroben Bedingungen kultiviert. Bei Erreichen einer OD_{578} von 0.3 wurden Proben entnommen (aerobe Zellen) und danach die Bakteriensuspensionen sofort in Anaerobflaschen überführt. Nach Zugabe von 40 mM Pyruvat wurden die Zellen für weitere 48 Stunden unter Sauerstoffausschluss bei 37 °C inkubiert. Von diesen fermentativen Zellen wurden ebenfalls Proben entnommen. Der Zellaufschluss und die Bestimmung der β -Galaktosidaseaktivitäten erfolgte wie in Kap. 2.9.1 beschrieben.

Tab. 10 β -Galaktosidaseaktivitäten in Miller Units (MU) von *P. aeruginosa* Wildtyp sowie der *anr*-, der *dnr*-, der IHF und der *narL*-Mutanten, welche die Reportergenfusion *packA* des *ackA-pta*-Promoters mit *lacZ* enthielten.

Die Zellen wurden in LB-Medium aerob kultiviert und bei Erreichen einer OD_{578} von 0.3 in Anaerobflaschen überführt. Nachdem 40 mM Pyruvat zugegeben worden war, wurde die Bakteriensuspension für 48 Stunden bei 37 °C inkubiert. Es wurden Proben von aeroben und fermentativen Zellen entnommen und davon die β -Galaktosidaseaktivitäten bestimmt, wie unter 2.9.1 beschrieben.

packA in Bakterienstamm	β -Galaktosidaseaktivität (MU^1)	
	aerob	fermentativ
<i>P. aeruginosa</i>		
Wildtyp (PAO1)	95	355
<i>anr</i> -Mutante (PAO6261)	90	110
<i>dnr</i> -Mutante (RM536)	104	201
IHF-Mutante (CHA-A2)	45	90
<i>narL</i> -Mutante (PAO9104)	102	290

¹ Miller Units. Die Formel zur Berechnung der Miller Units findet sich in Kap. 2.9.1.

Das *ackA*-Gen wird in fermentativen *P. aeruginosa* Wildtypzellen 3.7-fach stärker induziert als in aerob wachsenden Zellen. In der *narL*-Mutante ist die β -Galaktosidaseaktivität unter fermentativen Bedingungen fast so hoch wie beim Wildtyp. In der *dnr*-Mutante wird die Expression von *ackA-pta* unter fermentativen Bedingungen im Vergleich zu aeroben Bedingungen zwar induziert, aber nur noch 2-fach. Bei der *anr*- und der IHF-Mutante ist die β -Galaktosidaseaktivität unter fermentativen Bedingungen gegenüber dem *P. aeruginosa* Wildtyp unter aeroben Bedingungen nicht mehr erhöht.

Die Experimente mit der Reportergenfusion *packA* ergaben, dass die Regulatoren Anr und IHF für die Induktion der Genexpression von *ackA-pta* unter fermentativen Bedingungen essentiell sind. Die Beteiligung des Regulators Dnr kann nicht zweifelsfrei beantwortet werden. Unter anaeroben nitrat-respirativen Bedingungen (siehe DNA-Microarray in 3.3.4.3.2.1) spielt Dnr keine Rolle, aber unter Pyruvat-fermentierenden Bedingungen (siehe Reportergenfusion in 3.3.4.3.2.2) wird Dnr für eine maximale Induktion des *ackA-pta*-Locus benötigt. Der Nitrat-Regulator NarXL ist nicht an der Expression dieses Operons beteiligt.

3.3.4.3.2.3 Bestimmung der Phosphotransacetylase-Aktivität

Da die Genexpression des *ackA-pta*-Locus von aerob auf fermentativ nur etwa 4-fach ansteigt, wurde zusätzlich noch die Enzymaktivität des *pta*-Genproduktes gemessen. Die Phosphotransacetylase-Aktivitäten der im aeroben Milieu kultivierten Zellen von *P. aeruginosa* Wildtyp, der *ldhA*- und der *pta*-Mutante wurden mit den entsprechenden Pta-Aktivitäten der Pyruvat-fermentierenden Zellen verglichen. Dazu wurden zuerst zellfreie Proteinextrakte von allen drei Stämmen hergestellt, wie unter 2.9.2.1 beschrieben. Die einzelnen Pta-Aktivitäten wurden danach direkt in den verschiedenen Proteinextrakten anhand der Bildung von Acetyl-CoA aus den Substraten Acetyl-Phosphat und CoA bestimmt (siehe 2.9.2.2).

Die Aktivität der Phosphotransacetylase im *P. aeruginosa* Wildtyp ist unter fermentativen Bedingungen mit Pyruvat ungefähr 6-mal höher als unter aeroben Bedingungen (siehe Tab. 11). Interessanterweise unterscheiden sich die Pta-Aktivitäten der *ldhA*-Mutante nicht signifikant von denen des Wildtyps (siehe Tab. 11). Auch hier konnte unter Pyruvat-fermentierenden Bedingungen eine 6-mal höhere Aktivität der Pta gemessen werden als im aeroben Milieu. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass eine fehlende Aktivität der fermentativen Lactat-Dehydrogenase nicht durch eine Erhöhung der Phosphotransacetylase-Aktivität kompensiert wird. Das war auch nicht anders erwartet, da die Umwandlung von Pyruvat zu Lactat (LdhA) zur Regenerierung von NAD^+ und die Reaktionen von Acetyl-CoA zu Acetat (Pta und AckA) zur ATP-Regenerierung dienen.

Die Kontrollmessung in der *pta*-Mutante zeigte erwartungsgemäß nur eine sehr geringe Aktivität unter beiden Bedingungen. Diese könnte durch andere Enzyme im Proteinextrakt verursacht werden, die ebenfalls Acetyl-Phosphat und CoA als Substrate akzeptieren und in Acetyl-CoA umwandeln. Alternativ dazu könnte der Grund für die Änderung der Absorption bei 233 nm (siehe Absorptionsmessung beim Pta-Enzymtest unter 2.9.2.2) aber auch an der

Konzentrationsänderung von anderen Substanzen im zellfreien Extrakt liegen, die gar nicht an der hier untersuchten Reaktion beteiligt sind. Es bleibt jedoch festzuhalten, dass dieser geringe Hintergrund vernachlässigt werden kann.

Tab. 11 Phosphotransacetylase-Aktivitäten in den zellfreien Proteinextrakten von *P. aeruginosa* Wildtyp sowie der *pta*- und der *ldhA*-Mutante.

Dabei entspricht 1 Unit der Bildung von 1 μmol Acetyl-CoA aus Acetylphosphat und CoA in 60 min bei 30 °C.

Bakterienstamm	Pta-Aktivität [U/mg ¹]	
	aerob	fermentativ
<i>P. aeruginosa</i>		
Wildtyp (PAO1)	4.2	24
<i>ldhA</i> -Mutante (PAO-ME3)	4.3	26
<i>pta</i> -Mutante (PAO-ME1)	0.36	0.54

¹ Units pro mg Gesamtprotein im zellfreien Extrakt.

3.3.4.3.3 Computergestützte Untersuchung des Promotorbereiches von *ackA-pta*

Für die Analyse der Promotorstruktur wurde der potentielle Promotorbereich stromaufwärts der Genloci *ackA-pta* auf Bindestellen von bekannten Regulatorproteinen in *P. aeruginosa* untersucht. Dabei kam das „Weight Matrix Search“-Programm der PRODORIC-Datenbank zum Einsatz, wie in Kap. 2.11.2 beschrieben (Münch *et al.*, 2003).

Es wurde aus der PRODORIC-Datenbank eine Sequenz von etwa 350 bp, die stromaufwärts des *ackA*-Startkodons liegt, ausgewählt und analysiert. In Tab. 12 sind die identifizierten potentiellen Bindestellen für die Regulatoren Anr/Dnr, IHF und NarL mit ihrer Position vor dem Translationsstartpunkt und der prozentualen Ähnlichkeit zur jeweiligen Konsensussequenz aufgeführt.

Die *in silico*-Analyse ergab keine weiteren signifikanten Treffer für mögliche Bindestellen von anderen Regulationsproteinen, wie z.B. Fur, MexR, RhlR, LasR oder ArgR im untersuchten Promotorbereich.

Tab. 12 Positionen von potentiellen Bindestellen der Regulatoren Anr und IHF in der Promotorsequenz des Genlocus *ackA-pta* und ihre Sequenzidentitäten zur jeweiligen Konsensussequenz.

Regulator	Position vor Startkodon (bp)	Sequenz der Bindestelle ¹	Identität mit Konsensussequenz (%)
Anr		TTGMYVKSVRTCAR	Konsensus
	182	TTGATTTTCATCAG	88
IHF		CAATWSATTGAATTT	Konsensus
	128	CAACACCTGCGCCAC	87
NarL		TACYNMT	Konsensus
	258	TACGCAT	94

¹ nach der UIPAC-Nomenklatur für Nukleotidsäuresequenzen (Cornish-Bowden; 1985): **B** = C,G,T; **D** = A,G,T; **H** = A,C,T; **K** = G,T; **M** = A,C; **R** = A,G; **S** = G,C; **V** = A,C,G; **W** = A,T; **Y** = C,T; **N**=A,C,G,T

Die experimentellen anaeroben Inkubations-Versuche mit der *P. aeruginosa anr*-Mutante haben im Gegensatz zu den gleichen Versuchen mit der *dnr*-Mutante einen negativen Effekt auf das Überleben und die Fermentation von Pyruvat gezeigt (Kap. 3.3.5.1). Daraus kann geschlossen werden, dass das identifizierte Sequenzmotiv stromaufwärts von *ackA-pta* eine potentielle Bindestelle für das Anr-Protein ist. Die Beteiligung des Anr-Regulators an der Expression des *pta-ackA*-Locus konnte zusätzlich sowohl mit dem *lacZ*-Reportergenkonstrukt *packA* (siehe 3.3.4.3.2.2) als auch mit den DNA-Microarray-Experimenten (siehe 3.3.4.3.2.1) bestätigt werden. Bei den beiden voneinander unabhängigen Methoden hatte der Knockout im *dnr*-Gen keinen großen Einfluss auf die Induktion der Genexpression von *ackA-pta* unter anaerob-fermentativen Bedingungen im Vergleich zum aeroben Milieu. Die *anr*-Mutante hingegen zeigte bei diesen Versuchen einen deutlichen Effekt: Hier unterblieb die im Wildtyp vorhandene 4-6 fache Induktion der Genexpression des *ackA-pta*-Locus, was für eine eindeutige Beteiligung des Anr-Regulators an diesem Prozess spricht.

Der mögliche Einfluss des Regulator NarL auf die Genexpression des *ackA-pta*-Locus wird in Kap. 3.3.5.3 näher diskutiert.

In Abb. 18 sind die gefundenen Bindestellen für die Regulatoren Anr, IHF und NarL in der Promotorregion des 5'-Bereichs von Genlocus *ackA-pta* grafisch dargestellt.

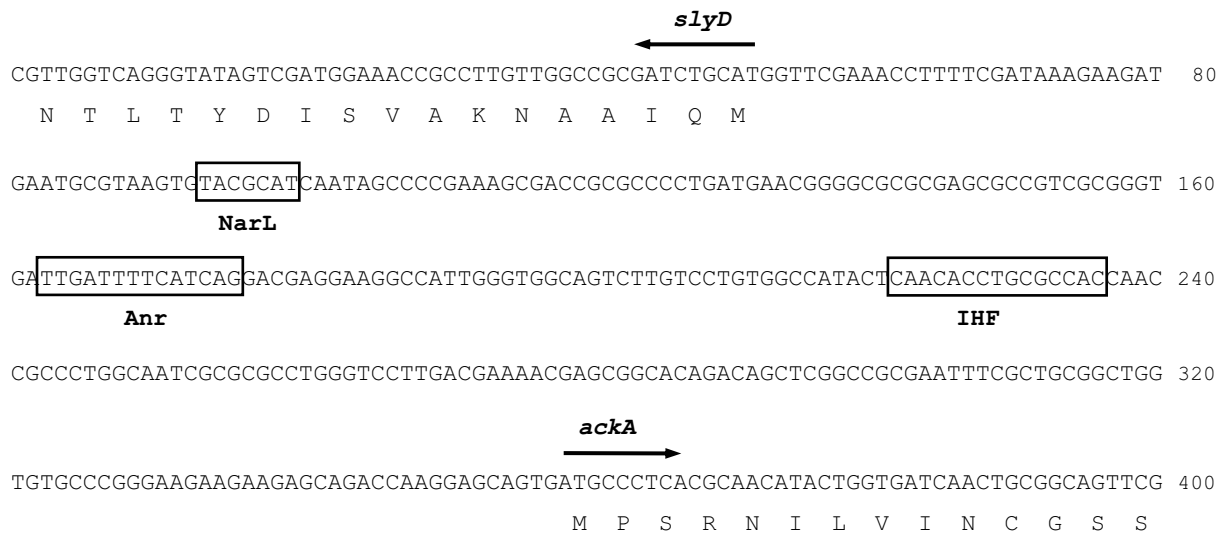


Abb. 18 Promotorbereich des Genlocus *ackA-pta* in *P. aeruginosa*.

Die Startpunkte der offenen Leseraster sind mit einem Pfeil markiert (Pfeile zeigen in die jeweilige Richtung der Translation) und die von der Gensequenz abgeleitete Aminosäuresequenz ist darunter geschrieben. Die möglichen Bindestellen für die Regulatoren NarL, Anr sowie IHF in der „*intergenic region*“ sind eingerahmt.

ackA, kodiert für Acetatkinase; *slyD*, kodiert für Peptidyl-Prolyl cis-trans Isomerase SlyD.

3.3.5 Einfluss von bekannten Regulatoren in *Pseudomonas aeruginosa* auf die Fermentation von Pyruvat

Um eine mögliche Beteiligung von bekannten Regulatoren aus *P. aeruginosa* am Gesamtprozess der Pyruvat-Fermentation zu identifizieren, wurden verschiedene Mutanten auf ihre Fähigkeit getestet, anaerob in der Anwesenheit von Pyruvat zu überleben. Die *P. aeruginosa* Regulationsmutanten *anr*, *dnr*, *narL* sowie *himA* (IHF-Mutante) wurden aerob in OS-Minimalmedium kultiviert, zentrifugiert und das Zellpellet gewaschen. Anschließend wurden die Pellets sofort in OS-Medium mit 2.5 g/l Hefeextrakt suspendiert und bei einer OD₅₇₈ von ungefähr 0.3 unter anaeroben Bedingungen mit 20 mM Pyruvat inkubiert, wie schon für den *P. aeruginosa* Wildtyp beschrieben. Die Lebendzellzahlen wurden mit der CFU-Methode bestimmt und HPLC-Analysen von den Kulturüberständen durchgeführt, wie für den Wildtyp unter 3.3.2 und 3.3.3 beschrieben.

3.3.5.1 Die Redoxregulatoren Anr und Dnr

Die *P. aeruginosa* *anr* und *dnr* Gene kodieren für die Sauerstoffregulatoren Anr bzw. Dnr (siehe Einleitung unter 1.4.1). Das Anr-Protein detektiert Sauerstoff und ist der essentielle Regulator für die Arginin-Fermentation und die Nitrat-Respiration (Galimand *et al.*, 1991; Sawers *et al.*, 1991). Dnr detektiert N-Oxide und aktiviert die Transkription von verschiedenen Genen, welche für die Denitrifikation gebraucht werden. Die Transkription von *dnr* selbst ist Anr-abhängig. Es konnte gezeigt werden, dass beide Regulator-Proteine eine regulatorische Kaskade bilden (Arai *et al.*, 1997).

Die Lebendzellzahlen der *dnr* Mutante blieben über einen gleich langen Zeitraum der anaeroben Inkubation konstant wie diejenigen des *P. aeruginosa* Wildtyps (Abb. 19). Dies war auch nicht anders erwartet, da bei den Experimenten weder Nitrat noch Nitrit verwendet wurden. Die HPLC-Analysen der *dnr* Mutante zeigten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede in der Abnahme der Pyruvat-Konzentration und der Bildung von Fermentationsprodukten verglichen mit dem Wildtyp (vergleiche Abb. 20 a mit Abb. 20 b). Diese Ergebnisse schließen eine essentielle Beteiligung des Dnr-Regulons an der Pyruvat-Fermentation aus.

Die *ackA-lacZ*-Fusion ist fermentativ induziert und der Promotorbereich von *ackA-pta* enthält eine Anr-Bindestelle (siehe Abb. 18 in Kap. 3.3.4.3.3). Der Einfluss des Anr-Regulators auf die Genexpression von *ackA-pta* konnte sowohl mit DNA-Microarray-Experimenten als auch mit einer *lacZ*-Reportergenfusion nachgewiesen werden. In der Tat ist die *anr* Mutante nicht

dazu fähig, gleich lang wie der *P. aeruginosa* Wildtyp zu überleben. Auch die Umwandlung von Pyruvat in Lactat, Acetat und Succinat stoppte nach 10 Tagen bei einer verbleibenden Konzentration von 6 mM Pyruvat (Abb. 20 c) und gleichzeitig begann die Lebendzellzahl (CFU) der *anr* Mutante zu sinken (Abb. 19). Daraus kann geschlossen werden, dass das Anr Protein für *P. aeruginosa* nicht für den Übergang von aeroben zu anaeroben Bedingungen gebraucht wird. Dieser Sauerstoffregulator ist jedoch essentiell für ein verlängertes Überleben von *P. aeruginosa* unter anaeroben Bedingungen ohne externe Elektronenakzeptoren.

3.3.5.2 Der *integration host factor* IHF

Auch der Einfluss des *integration host factors* (IHF) auf das anaerobe Überleben bei der Pyruvat-Fermentation wurde untersucht. IHF ist ein DNA-Bindeprotein, das durch Biegung der DNA die Transkription von Zielgenen aktiviert (siehe Einleitung unter 1.4.3). Dieser Regulator ist ebenfalls essentiell für die Transkription von vielen anaerob induzierten Genen (Krieger *et al.*, 2002; Rompf *et al.*, 1998).

Die Lebendzellzahl der IHF-Mutante fiel sehr stark von Beginn der anaeroben Inkubation an bis hinunter auf 0.3 % CFU am 16. Tag (Abb. 19). Auch in der HPLC-Analyse konnte weder eine Abnahme der Pyruvat-Konzentration noch eine Bildung von Fermentationsprodukten beobachtet werden (Abb. 20 e). Die IHF Mutante zeigte somit den deutlichsten Phänotyp aller untersuchten Regulationsmutanten von *P. aeruginosa*.

3.3.5.3 Der Nitratregulator NarL

Keine Unterschiede konnten beim Vergleich der CFU-Kurven (siehe Abb. 19) und der HPLC-Ergebnisse (vergleiche Abb. 20 a mit Abb. 20 d) zwischen der *narL* Knockout-Mutante und dem *P. aeruginosa* Wildtyp entdeckt werden. NarL ist der zugehörige Transkriptionsregulator für den Nitrat-Sensor NarX (siehe Einleitung unter 1.4.2). Dieses Ergebnis zeigt, dass für eine funktionierende Pyruvat-Fermentation in *P. aeruginosa* der Zweikomponenten-Regulator NarXL nicht benötigt wird. Beim „*Weight-Matrix-Search*“ im möglichen Promotorbereich des Genlocus *ackA-pta* konnte allerdings ein NarL-Bindemotiv identifiziert werden (siehe 3.3.4.3.3).

Dieser scheinbare Widerspruch löst sich auf, wenn die Ergebnisse aus einem in Kap. 3.3.10 näher beschriebenen Experiment mit berücksichtigt werden: Wenn Nitrat und Pyruvat gleichzeitig als Energiesubstrate vorhanden sind, dann wird von *P. aeruginosa* zuerst das gesamte Nitrat in Stickstoff umgewandelt (Nitrat-Atmung, siehe unter 1.2), bevor es zu einer Fermentation von Pyruvat kommt. Werden nun alle vorhandenen Daten kombiniert, dann

kann daraus geschlossen werden, dass der Nitrat-Regulator NarL in Anwesenheit von Nitrat im Promotorbereich von *ackA-pta* bindet und die Expression dieses Genlocus unterbindet. Eine *narL* Knockout-Mutante zeigt nur dann keine Wirkung auf die Pyruvat-Fermentation, wenn kein Nitrat im Medium vorhanden ist (siehe Abb. 19 und Abb. 20 d) bzw. das gesamte Nitrat verbraucht ist.

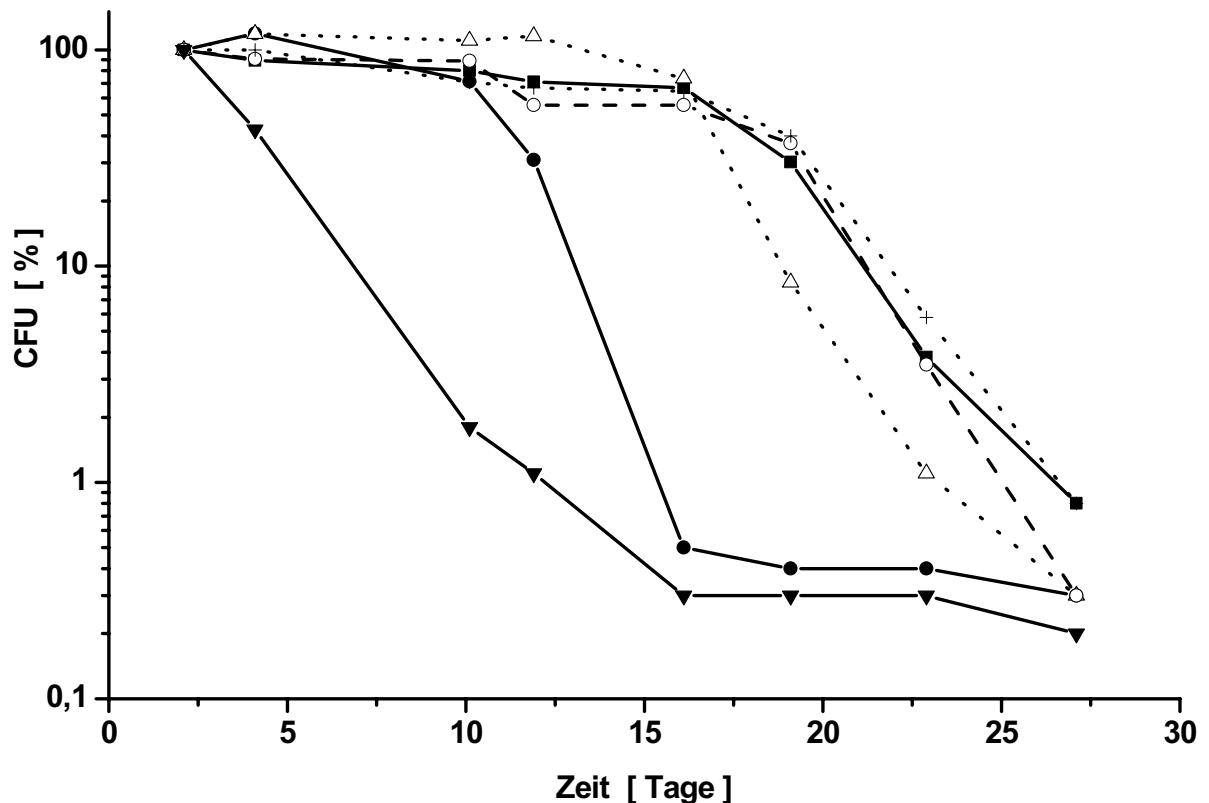


Abb. 19 Vergleich der Lebendzellzahlen (in CFU auf LB-Agarplatten) des *P. aeruginosa* Wildtyps, der *anr*-, der *dnr*-, der *narL*-, der IHF- und der *hemA*-Mutante, welche unter anaeroben Bedingungen mit Pyruvat inkubiert wurden.

Die Anfangswerte der nach 50 Stunden anaerober Inkubation auf aeroben LB-Agarplatten bestimmten CFUs sind zum besseren Vergleich auf 100 % gesetzt worden. 100 % entsprechen bei *P. aeruginosa* Wildtyp mit Pyruvat (■) $5.6 \cdot 10^8$ Zellen / ml, bei der *anr*-Mutante (●) $4.6 \cdot 10^8$ Zellen / ml, bei der *dnr*-Mutante (Δ) $4.7 \cdot 10^8$ Zellen / ml, bei der *narL*-Mutante (○) $5.6 \cdot 10^8$ Zellen / ml, bei der IHF-Mutante (▼) $5.5 \cdot 10^8$ Zellen / ml und bei der *hemA*-Mutante (+) $4.6 \cdot 10^8$ Zellen / ml.

Die zeitliche Veränderung der Lebendzellzahlen (in CFU) für die *dnr*- (Δ), die *narL*- (○) und die *hemA*-Mutante (+) sind mit derjenigen für den *P. aeruginosa* Wildtyp (■) vergleichbar. Im Gegensatz dazu verringert sich die Lebendzellzahl der *anr*-Mutante (●) deutlich früher. Die Lebendzellzahl der IHF-Mutante (▼) zeigt von Beginn der anaeroben Inkubation an eine logarithmische Abnahme. Die *hemA*-Mutante wird in 3.3.11 näher erläutert.

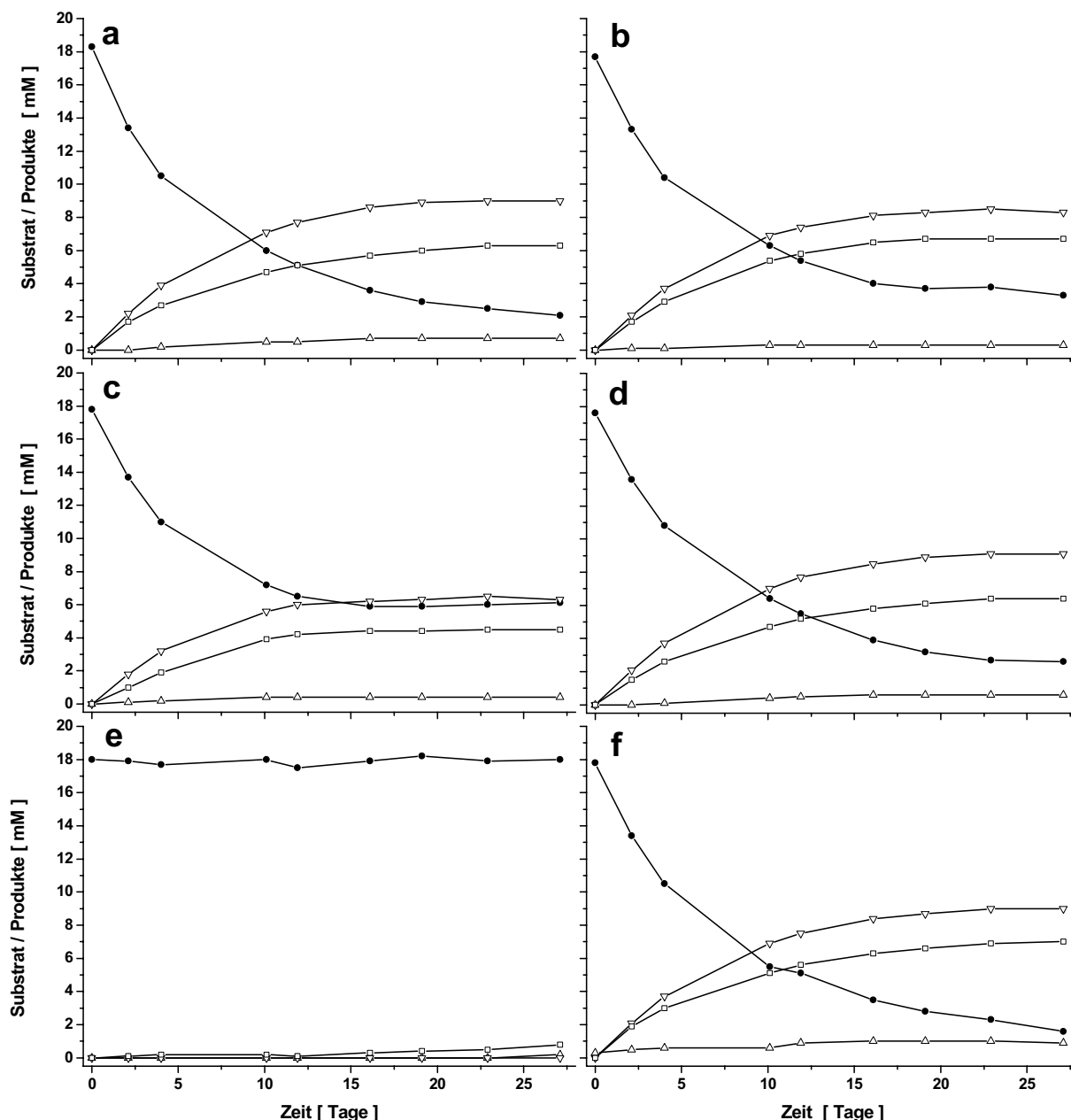


Abb. 20 Zeitliche Abhängigkeit des Verbrauchs von Pyruvat und der Bildung von Fermentationsprodukten, welche durch HPLC-Analysen von Kulturüberständen von *P. aeruginosa* Wildtyp (a) und den Mutanten *dnr* (b), *anr* (c), *narL* (d), *IHF* (e) und *hemA* (f) bestimmt wurden.

Die Bakterien wurden dazu in Minimalmedium mit 20 mM Pyruvat im anaeroben Milieu 27 Tage kultiviert. Zu den angegebenen Zeiten wurden steril Proben entnommen und die Kulturüberstände mit HPLC analysiert. Konzentrationen von Pyruvat (●), Lactat (▽), Acetat (□) und Succinat (Δ) im Medium. Die Abnahme der Pyruvat-Konzentration und die Zunahme der Fermentationsprodukt-Konzentrationen zeigen für die *dnr*- (b), die *narL*- (d) und die *hemA*-Mutante (f) keine signifikanten Unterschiede zum *P. aeruginosa* Wildtyp (a). Bei der *anr*-Mutante (c) ist ein deutlicher Unterschied zum Wildtyp (a) zu sehen. Die *IHF*-Mutante (e) zeigt keinen Verbrauch von Pyruvat und keine Bildung von Fermentationsprodukten. Die *hemA*-Mutante wird in 3.3.11 näher erläutert.

3.3.6 Zusammenfassung der Pyruvat-Fermentation in *Pseudomonas aeruginosa* Wildtyp und den untersuchten Mutanten

3.3.6.1 Bilanz der Pyruvat-Fermentation

In Tab. 13 sind nochmals die Ergebnisse der Fermentationsversuche von *P. aeruginosa* Wildtyp und den verschiedenen Mutanten aus den vorhergehenden Kapiteln zusammengefasst. Es sind jeweils die Endkonzentrationen der gebildeten Fermentationsprodukte und die Konzentrationsabnahme von Pyruvat nach 23 Tagen angegeben. Zum besseren Vergleich sind die Stoffmengenverhältnisse der Produkte, bezogen auf verbrauchtes Pyruvat, ausgerechnet worden.

Tab. 13 Zusammenfassung der Bildung von Fermentationsprodukten in *P. aeruginosa* Wildtyp und einigen Mutanten.

Die Stämme wurden bei einer OD₅₇₈ von 0.3 über einen Zeitraum von 23 Tagen bei 37 °C in OS-Medium mit 20 mM Pyruvat inkubiert. Die Konzentrationen der Pyruvat-Abnahme und Fermentationsprodukt-Zunahmen sind mittels HPLC-Analysen der Kulturüberstände quantifiziert worden.

<i>P. aeruginosa</i> Stämme	Verbrauchtes Pyruvat (mM)	Gebildete Fermentationsprodukte						
		Konzentration (mM)			Verhältnis (mol/mol Pyruvat)			
		Lactat	Acetat	Succinat	Lactat	Acetat	Succinat	Gesamt
Wildtyp	16.9	9.2	7.1	0.7	0.54	0.42	0.04	1.00
<i>ldhA</i> Mutante	1.1	0	0.6	0.5	n.b. ¹	n.b.	n.b.	n.b.
<i>pta</i> Mutante	4.8	2.2	1.5	0.4	0.46	0.31	0.08	0.85
IHF Mutante	0.4	0	0.5	0	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
<i>anr</i> Mutante	11.8	6.5	4.5	0.4	0.55	0.38	0.03	0.96
<i>dnr</i> Mutante	15.3	8.5	6.7	0.3	0.55	0.44	0.02	1.01
<i>narL</i> Mutante	16.3	9.1	6.4	0.6	0.56	0.39	0.04	0.99
<i>hemA</i> Mutante ²	16.7	9.0	6.9	0.7	0.54	0.41	0.04	0.99

¹ nicht berechnet

² Die *hemA*-Mutante wird in 3.3.11 näher erläutert.

Die Verhältnisse (Fermentationsprodukt / verbrauchtes Pyruvat) für den *P. aeruginosa* Wildtyp und die *anr*-, *dnr*-, *narL*- sowie *hemA*-Mutanten zeigen keine signifikanten Unterschiede. Allerdings stoppte die *anr*-Mutante nach 10 Tagen die bis zu diesem Zeitpunkt

„normale“ Fermentation von Pyruvat, wie in Kap. 3.3.5.1 beschrieben worden ist. Gar keine Fermentationsprodukte bilden dagegen die *ldhA*- und die IHF-Mutante. Im Kulturmedium der *pta*-Mutante konnten nur sehr geringe Konzentrationen an Fermentationsprodukten gefunden werden. Darüber hinaus weichen bei der *pta*-Mutante die Verhältnisse etwas von denen des Wildtyps ab und auch die Gesamtbilanz ist nicht ausgeglichen.

3.3.6.2 Regulation der Pyruvat-Fermentation

Die Enzymaktivität der Phosphotransacetylase (Pta) war unter fermentativen Bedingungen 6 mal höher als im aeroben Milieu (siehe 3.3.4.3.2.3). Auch die gentechnisch konstruierte *lacZ*-Reporterengenfusion des *ackA-pta*-Promotorbereichs zeigte eine 3.7-fache Induktion der Genexpression des *ackA-pta*-Locus unter Pyruvat-fermentierenden Bedingungen (siehe 3.3.4.3.2.2). In einem denitrifizierenden Milieu waren die Gene *ackA* und *pta* ebenfalls induziert, was zusätzlich mit DNA-Microarrays bestätigt werden konnte (siehe 3.3.4.3.2.1).

Um eine mögliche Beteiligung von bekannten Regulatoren aus *P. aeruginosa* an der Pyruvat-Fermentation zu identifizieren, wurden verschiedene Mutanten auf ihre Fähigkeit getestet, anaerob in der Anwesenheit von Pyruvat zu überleben. Während der Regulator Dnr nicht an der Pyruvat-Fermentation beteiligt ist, konnte gezeigt werden, dass der Hauptregulator für den anaeroben Stoffwechsel, Anr, essentiell für ein verlängertes Überleben unter diesen Bedingungen ist (siehe 3.3.5.1). Die IHF-Mutante zeigte den eindeutigsten Phänotyp und war nicht in der Lage, anaerob mittels Pyruvat-Fermentation zu überleben (siehe 3.3.5.2).

Die Beteiligung des Anr-Regulators an der Expression des *pta-ackA*-Locus konnte zusätzlich sowohl mit dem *lacZ*-Reporterengenkonstrukt (siehe 3.3.4.3.2.2) als auch mit den DNA-Microarray-Experimenten (siehe 3.3.4.3.2.1) gezeigt werden. Bei beiden Methoden hatte die Knockout Mutation im *dnr*-Gen keinen großen Einfluss auf die Induktion der Genexpression von *ackA-pta* unter fermentativen Bedingungen im Vergleich zum aeroben Milieu. Bei der *anr*-Mutante hingegen unterblieb die im Wildtyp vorhandene 4-6 fache Induktion der Genexpression des *ackA-pta*-Locus.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Redox-Regulator Anr sowie der *integration host factor* (IHF) den Genlocus *pta-ackA* induzieren. Ein Defekt in einem dieser Regulatoren führt, wie beschrieben, entweder zu einer verminderten Pyruvat-Fermentation (bei Anr) oder dieser Prozess kommt ganz zum Erliegen (bei IHF). Dem gegenüber hat der Nitrat-Regulator NarL nur bei Vorhandensein von Nitrat eine Auswirkung auf die Genexpression.

3.3.7 Fermentation von Pyruvat in *Pseudomonas aeruginosa* bei zunehmender Konzentration der Fermentationsprodukte

Während des fermentativen Wachstums von *E. coli* werden aus Pyruvat schwache Carbonsäuren gebildet, die den pH-Gradienten an der Zellmembran vermindern und das Cytoplasma ansäuern (Böck & Sawers, 1996). Darüber hinaus führen zu hohe Konzentrationen der dabei entstehenden Anionen (wie z.B. Acetat) im Zellinnern zu einer Verminderung der Wachstumsgeschwindigkeit.

Es stellte sich die Frage, ob die steigenden Konzentrationen der bei der Pyruvat-Fermentation gebildeten Produkte in *P. aeruginosa* ebenfalls einen Effekt auf die Fermentationsprozesse ausüben. Dies konnte allerdings nicht in Analogie zu den entsprechenden Versuchen in *E. coli* am Wachstumsverhalten identifiziert werden, da die Fermentation von Pyruvat in *P. aeruginosa* zu keiner Vermehrung der Zellzahl führt (siehe Kap. 3.3). Aus diesem Grund wurde ein so genannter „resting cells“-Ansatz mit hoher Zelldichte gewählt. Dabei wurden die Zellen aerob in OS-Minimalmedium kultiviert und nach 13 Stunden geerntet. Das erhaltene Zellpellet wurde gewaschen und anschließend in so viel OS-Minimalmedium mit 20 mM Pyruvat suspendiert, dass sich eine OD₅₇₈ von 6.2 ergab. Diese dichte Zellsuspension wurde unter anaeroben Bedingungen 146 Stunden inkubiert, wobei nach 50 und 82 Stunden nochmals jeweils 100 mM Pyruvat zugegeben worden war. In bestimmten Zeitintervallen wurden steril Proben entnommen und die Kulturüberstände durch HPLC-Analysen untersucht, wie unter 2.10 beschrieben.

Dabei wurden solange steigende Konzentrationen von Lactat, Acetat und Succinat identifiziert, bis die anfangs zugegebenen 20 mM Pyruvat komplett verbraucht waren (Abb. 21 a). Diese Kurven der Pyruvat-Abnahme und der Konzentrationszunahme der Fermentationsprodukte innerhalb von 25 Stunden zeigen eine hohe Übereinstimmung zu den HPLC-Ergebnissen aus Kap. 3.3.3 (Abb. 13). Die Abnahme von Pyruvat erfolgte dort allerdings über einen Zeitraum von 18 Tagen, weil nur eine OD₅₇₈ von 0.3 an *P. aeruginosa*-Zellen eingesetzt worden war. Somit besteht, wie nicht anders erwartet, eine lineare Korrelation zwischen Optischer Dichte und Geschwindigkeit der Pyruvat-Fermentation.

Bei weiterer Zugabe von jeweils 100 mM Pyruvat nach 50 und 82 Stunden, konnte eine erneute Zunahme der Konzentrationen von Lactat (bis 90 mM Endkonzentration), Acetat (bis 70 mM Endkonzentration) und Succinat (bis 10 mM Endkonzentration) ohne eine eindeutige Verringerung der Geschwindigkeit beobachtet werden (Abb. 21 b). Dabei blieben die Verhältnisse zwischen gebildeten Fermentationsprodukten und verbrauchtem Pyruvat immer

konstant. Daraus kann geschlossen werden, dass unter diesen Bedingungen („resting cells“-Ansatz) keine Inhibition der Pyruvat-Fermentation durch die Produkte Lactat, Acetat und Succinat stattfindet.

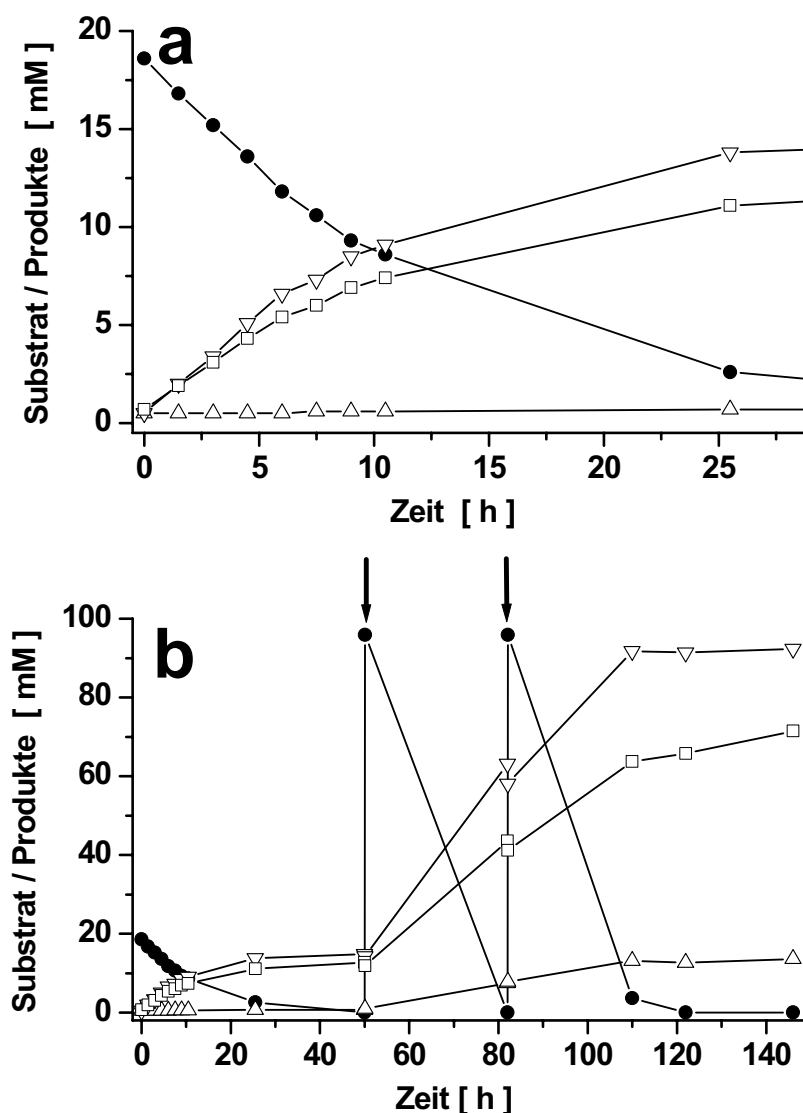


Abb. 21 Analyse der Produktinhibition der anaeroben Pyruvat-Fermentation mittels „resting cells“-Ansatz. Gezeigt ist die grafische Darstellung von HPLC-Analysen der Kulturüberstände von *P. aeruginosa* Wildtyp, der in OS-Minimalmedium bei einer OD_{578} von 6.2 mit 20 mM Pyruvat (a) sowie mit insgesamt 220 mM Pyruvat (b) im anaeroben Milieu inkubiert wurde.

Es wurden zu den angegebenen Zeiten steril Proben entnommen und die Kulturüberstände mittels HPLC analysiert. Zu Beginn wurden 20 mM Pyruvat (a) und nach 50 und 82 Stunden (mit Pfeilen markiert) nochmals jeweils 100 mM Pyruvat (b) zugegeben. Es zeigt sich eine Abnahme der Pyruvat-Konzentration (●) bei gleichzeitiger Zunahme der Konzentrationen von Lactat (▽), Acetat (□) und Succinat (△) im Medium. Die angehäuften Endprodukte der Fermentation haben darauf keinen Einfluss.

3.3.8 Der Effekt von externem Acetat auf die Geschwindigkeit der Pyruvat-Fermentation

Der Einfluss von hoher externer Acetat-Konzentration auf die Pyruvat-Fermentation in *P. aeruginosa* wurde nochmals genauer überprüft. Dazu wurde der gleiche „resting cells“-Versuchsaufbau benutzt wie im vorhergehenden Kapitel beschrieben. Bei den neuen Experimenten wurde bei einem pH-Wert von 7.2 in 100 mM Phosphat-Puffer noch zusätzlich 50 mM oder 100 mM Acetat vor Beginn der anaeroben Inkubation zugegeben.

Die Anwesenheit von 50 mM oder 100 mM Acetat bei einem pH-Wert von 7.2 führte zu keiner signifikanten Änderung der Kinetik der Pyruvat-Fermentation in *P. aeruginosa* (siehe Abb. 22). Bei beiden Versuchen nimmt die Konzentration an Acetat während der anaeroben Inkubation sogar noch zu. Dies belegt, dass Acetat, zumindest in den getesteten Konzentrationen von 50 und 100 mM, keinen negativen Einfluss auf die Pyruvat-Fermentation in *P. aeruginosa* hat. Dies bestätigt die prinzipiellen Befunde zur Produktakkumulation aus Kap. 3.3.7.

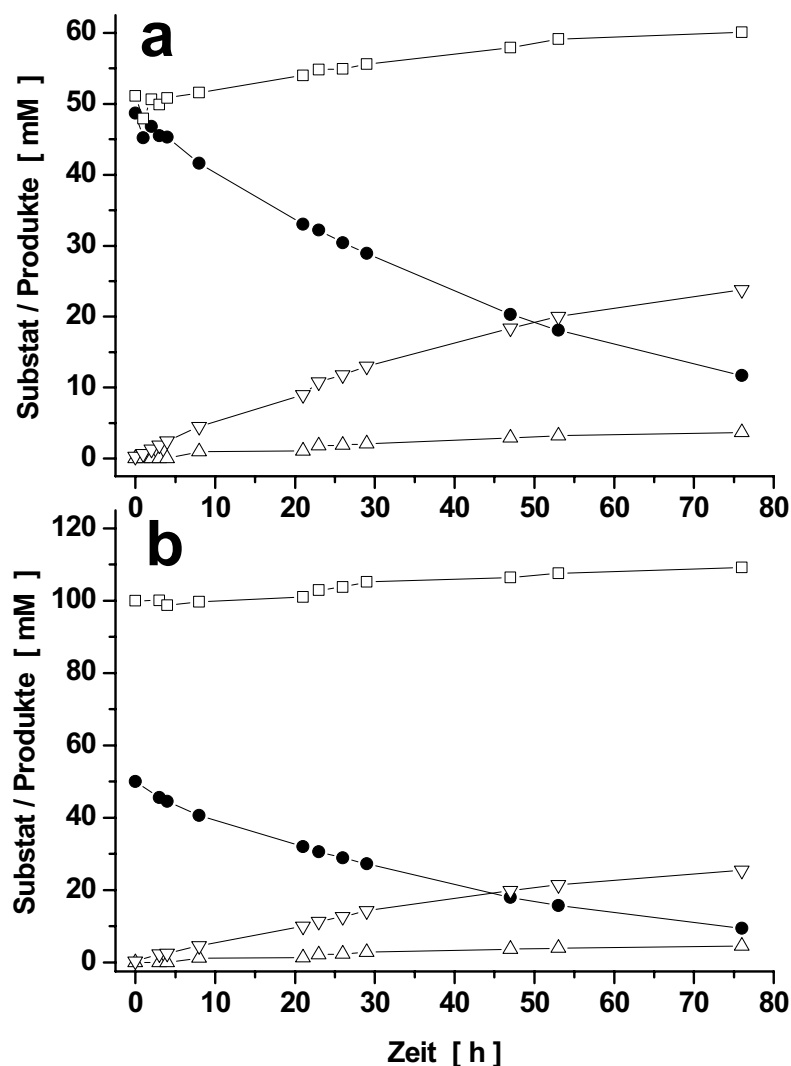


Abb. 22 Die Wirkung der extrazellulären Konzentration von Acetat auf die Pyruvat-Fermentation. Gezeigt sind HPLC-Analysen der Kulturüberstände von *P. aeruginosa* Wildtyp, welche als „resting cells“-Ansätze 76 Stunden in 100 mM Phosphat-Puffer (bei pH 7.2) mit 50 mM Pyruvat und zusätzlich 50 mM Acetat (a) bzw. 100 mM Acetat (b) im anaeroben Milieu inkubiert wurden.

Es wurden zu den angegebenen Zeiten steril Proben entnommen und die Kulturüberstände mit HPLC analysiert. Es zeigte sich eine Abnahme der Pyruvat-Konzentration (●) bei gleichzeitiger Zunahme der Konzentrationen von Lactat (▽), Acetat (□) und Succinat (△) im Puffer. Extrazellulär vorhandenes Acetat hat weder bei einer Konzentration von 50 mM (a) noch bei 100 mM (b) einen Einfluss auf die Pyruvat-Fermentation in *P. aeruginosa*.

3.3.9 Der Effekt des pH-Wertes auf die Geschwindigkeit der Pyruvat-Fermentation

Organische Säuren, wie z.B. Essigsäure, Zitronensäure oder Benzoesäure (bzw. deren Salze Acetat, Citrat oder Benzoat), werden häufig zum Konservieren von Lebensmitteln eingesetzt. Diese Säuren sind in der protonierten Form Zellmembran-permeabel und dissoziieren danach im Cytoplasma von Bakterien. Dies führt zu einer Ansäuerung des Zellinneren und zu einer Anhäufung von potentiell toxischen Anionen. In *E. coli* konnte gezeigt werden, dass die Aufnahme von schwachen Säuren den Wachstumsstress bei einem niedrigen externen pH-Wert verstärkt (Böck & Sawers, 1996). Niedrige pH-Werte des Kulturmediums, die noch keinen oder nur einen geringen Effekt auf das Wachstumsverhalten haben, führen bei Anwesenheit von schwachen Säuren zu einer starken Verminderung der Wachstumsgeschwindigkeit.

Es wurde untersucht, ob die Reaktionen der Pyruvat-Fermentation in *P. aeruginosa* ebenfalls eine pH-Abhängigkeit aufweisen. Dies konnte allerdings nicht in Analogie zu den entsprechenden Versuchen in *E. coli* am Wachstumsverhalten identifiziert werden, da die Fermentation von Pyruvat in *P. aeruginosa* zu keiner Vermehrung der Zellzahl führt (siehe Kap. 3.3). Daher wurde für diese Experimente wieder der „resting cells“-Versuchsaufbau gewählt. Der pH-Wert des gepufferten Minimalmediums wurde dabei in den verschiedenen Ansätzen von 5.0 bis 8.0 variiert, jeweils mit und ohne Zugabe von Benzoat als schwache Zellmembran-permeable Säure.

Zuerst wurde *P. aeruginosa* in M9-Minimalmedium mit 10 mM Gluconat, 20 mM Pyruvat und 50 mM Nitrat anaerob kultiviert. Nach 43 Stunden bei einer OD₅₇₈ von 1.4 wurden die Zellen geerntet. Nach dem Zentrifugieren wurden die Zellen gewaschen und danach im jeweiligen Puffer resuspendiert: In 100 mM MES-Puffer mit einem pH-Wert von 5.0 sowie in 100 mM Phosphat-Puffer mit pH-Werten von 6.0, 7.0 und 8.0. Diese „resting cells“-Ansätze von *P. aeruginosa* mit einer OD₅₇₈ von ungefähr vier wurden mit 50 mM Pyruvat unter anaeroben Bedingungen inkubiert. Um den Einfluss des internen pH-Werte zu bestimmen, wurden in Kontrollansätzen bei den gleichen pH-Werten und Bedingungen zusätzlich noch 50 mM Natrium-Benzoat zugegeben. Das Benzoat diffundiert, wie oben beschrieben, bei einem pH-Wert von 7 oder geringer ungeladen durch die Zellmembran und gibt danach in der Zelle ein Proton ab. Dies führt zu einer Ansäuerung des Cytoplasmas. In bestimmten Zeitintervallen wurden bei allen Ansätzen steril Proben entnommen und die Kulturüberstände durch HPLC-Analysen untersucht, wie unter 2.10 beschrieben.

Im Ansatz mit der *P. aeruginosa* Kultur, die bei einem pH-Wert von 6.0 inkubiert worden war, wurde das gesamte Pyruvat innerhalb der 76 Stunden verbraucht und die Konzentrationen von Lactat, Acetat und Succinat nahmen kontinuierlich zu (Abb. 23 a). Im Ansatz bei einem pH-Wert von 7.0 war die Geschwindigkeit der Pyruvat-Fermentation nur geringfügig geringer (Abb. 23 c). Im Ansatz bei einem äußeren pH-Wert von 8.0 war die Pyruvat-Fermentation sehr stark eingeschränkt (Abb. 23 e). Bei einem äußeren pH von 5.0 nahm weder die Konzentration von Pyruvat ab noch wurden Lactat, Acetat oder Succinat gebildet (nicht gezeigt).

Die Zugabe von Benzoat führte bei einem äußeren pH-Wert von 6.0 zu einer starken Reduzierung der Fähigkeit von *P. aeruginosa*, Pyruvat zu fermentieren (vergleiche Abb. 23 b mit Abb. 23 a). Die Konzentration von Acetat ist zwar gleich geblieben (ca. 12 mM), aber die erreichten Konzentrationen von Lactat und Succinat liegen unter denen aus dem entsprechenden Experiment ohne Benzoat. Das Benzoat ist demnach durch die Zellmembran diffundiert und hat den pH-Wert im Cytoplasma weiter erniedrigt. Wie schon gezeigt (für pH 5.0) ist ein pH-Wert kleiner 6.0 nicht mehr günstig für die Enzyme der Pyruvat-Fermentation.

Die Zugabe von Benzoat führte bei einem äußeren pH-Wert von 7.0 zwar zu einer signifikanten Verringerung der Pyruvat-Fermentation (vergleiche Abb. 23 d mit Abb. 23 c), allerdings bei weitem nicht so ausgeprägt wie beim Versuch mit pH 6.0.

Bei einem äußeren pH-Wert von 8.0 war beim Zusatz von Benzoat kein Unterschied in den Kurven der Pyruvat-Fermentation zum entsprechenden Versuch ohne Benzoat zu erkennen (vergleiche Abb. 23 f mit Abb. 23 e). Beide Reaktionen liefen gleich langsam und unvollständig ab. Dies war auch nicht anders zu erwarten, da Benzoat bei einem pH-Wert größer als 7 im Kulturmedium nicht mehr durch die Zellmembran diffundieren kann und es daher auch zu keiner Verringerung des cytoplasmatischen pH-Wertes kommt (Salmond *et al.*, 1984).

Es bleibt weiterhin festzuhalten, dass bei verschiedenen pH-Werten des Mediums unterschiedliche relative Mengen an Fermentationsprodukten bezogen auf Pyruvat von *P. aeruginosa* gebildet werden. Dies ist an den unterschiedlichen Produkt/Substrat-Verhältnissen deutlich zu erkennen (siehe Tab. 14).

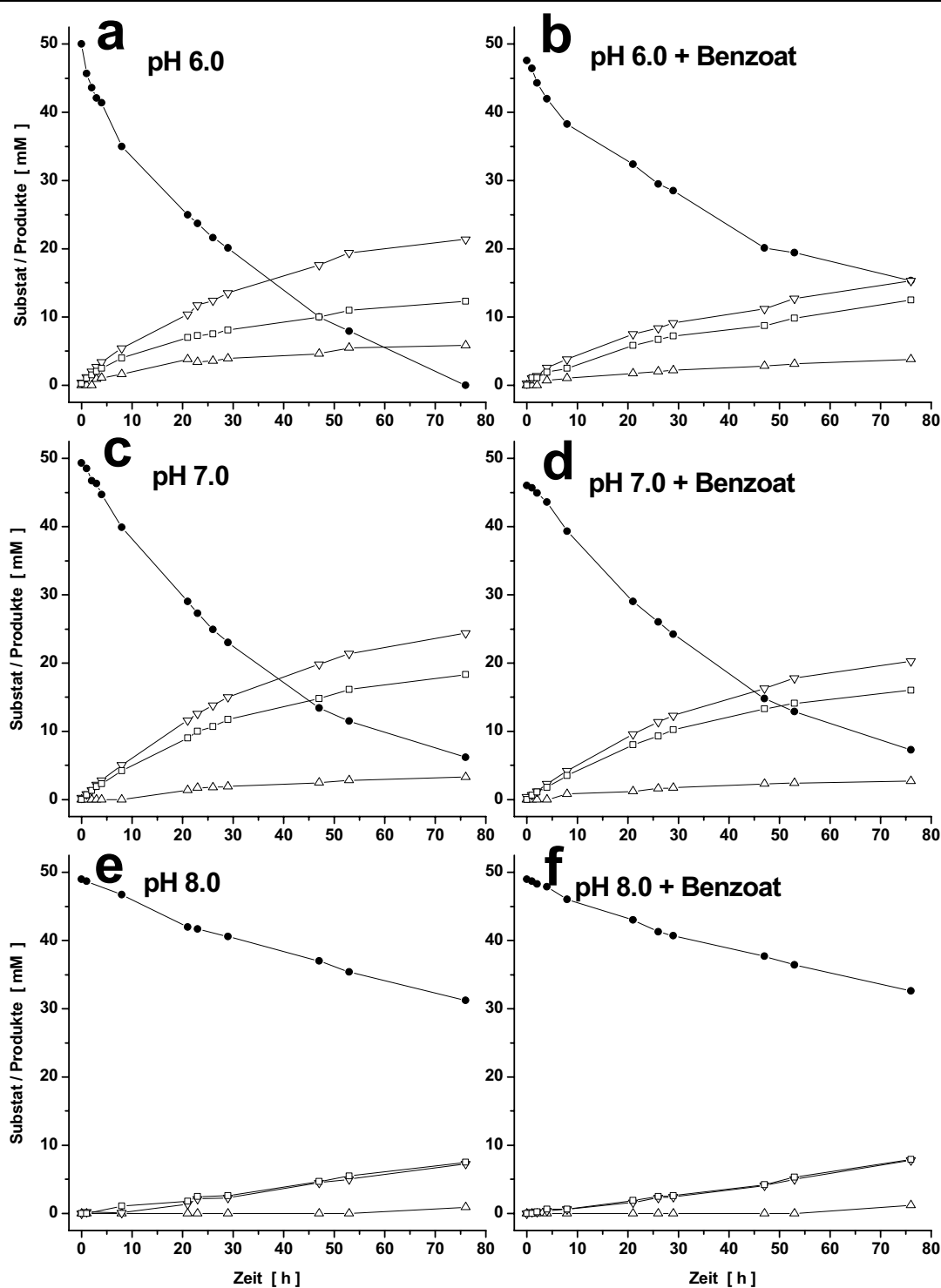


Abb. 23 Die Wirkung des extra- und intrazellulären pH-Wertes auf die Pyruvat-Fermentation. Gezeigt sind HPLC-Analysen der Kulturüberstände von *P. aeruginosa* Wildtyp, welche als „resting cells“-Ansätze 76 Stunden in 100 mM Phosphat-Puffer bei einem pH von 6.0 (a, b), 7.0 (c, d) und 8.0 (e, f) mit 50 mM Pyruvat im anaeroben Milieu inkubiert wurden.

Es wurden zu den angegebenen Zeiten steril Proben entnommen und die Kulturüberstände mit HPLC analysiert. Es zeigt sich eine Abnahme der Pyruvat-Konzentration (—●—) bei gleichzeitiger Zunahme der Konzentrationen von Lactat (—▽—), Acetat (—□—) und Succinat (—△—) im Puffer. In einem pH-Bereich von 6 bis 7 ist eine optimale Fermentation von Pyruvat durch *P. aeruginosa* zu beobachten. Niedrigere oder höhere pH-Werte führen zu einer deutlichen Reduzierung (siehe pH 8.0) oder sogar zu einer vollständigen Unterbindung (pH 5.0) der Pyruvat-Fermentation. Durch Zugabe von Benzoat kann der cytoplasmatische pH-Wert im Vergleich zum äußeren pH-Werte erniedrigt werden.

Tab. 14 Zusammenfassung der Bildung von Fermentationsprodukten mit *P. aeruginosa* Wildtyp bei verschiedenen pH-Werten.

Die „resting cells“-Ansätze von *P. aeruginosa* wurde bei einer OD₅₇₈ von 4 für 76 Stunden bei 37 °C in MES-Puffer (pH 5.0) oder Phosphat-Puffer (pH 6.0, 7.0 und 8.0) mit 50 mM Pyruvat inkubiert. Außerdem wurde bei den angegebenen Ansätzen 50 mM Benzoat zugegeben. Die Konzentrationen der Pyruvat-Abnahme und Fermentationsprodukt-Zunahmen sind mit HPLC-Analysen der Kulturüberstände quantifiziert worden.

Puffer- bedingungen (pH-Wert)	Verbrauchtes Pyruvat (mM)	Gebildete Fermentationsprodukte						
		Konzentration (mM)			Verhältnis (mol/mol Pyruvat)			
		Lactat	Acetat	Succinat	Lactat	Acetat	Succinat	Gesamt
5.0	5.2	0.0	0.0	0.0	n.b. ¹	n.b.	n.b.	n.b.
5.0 + Benzoat	2.0	0.0	0.0	0.0	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
6.0	50.0	21.4	12.3	5.8	0.43	0.25	0.12	0.80
6.0 + Benzoat	32.3	15.3	12.5	3.8	0.47	0.39	0.12	0.98
7.0	43.1	22.4	17.2	3.3	0.52	0.40	0.08	1.00
7.0 + Benzoat	38.7	20.3	16.0	2.7	0.52	0.41	0.07	1.00
8.0	18.8	7.3	7.5	0.9	0.39	0.40	0.05	0.84
8.0 + Benzoat	17.4	7.8	7.9	1.2	0.45	0.45	0.07	0.97

¹ nicht berechnet

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass *P. aeruginosa* eine optimale Pyruvat-Fermentation durchführen kann, wenn im umgebenden Medium ein pH-Wert im Bereich von 6 bis 7 vorherrscht. Dagegen verhindern pH-Werte von 5 oder 8 im Kulturmedium diesen Prozess. Durch Benzoat-Zugabe und der damit verbundenen Änderung des intrazellulären pH-Wertes von *P. aeruginosa* konnten die beobachteten Effekte verstärkt werden.

3.3.10 Die Fermentation von Pyruvat in *Pseudomonas aeruginosa* unter denitrifizierenden sowie Arginin-fermentierenden Bedingungen

Im folgenden wurde untersucht, ob Pyruvat in *P. aeruginosa* auch fermentiert wird, wenn gleichzeitig entweder Arginin oder Nitrat vorhanden ist. Dabei wurde wieder der „restings cells“-Versuchsaufbau gewählt, bei dem die Zellen in 100 mM Phosphat-Puffer (pH von 7.4) unter anaeroben Bedingungen mit einer OD₅₇₈ von ungefähr 8 inkubiert wurden.

P. aeruginosa wurde zuerst in OS-Minimalmedium mit 10 mM Gluconat, 10 mM Pyruvat und 50 mM Nitrat unter denitrifizierenden Bedingungen in Anaerobflaschen kultiviert. Nach 21 Stunden bei einer OD₅₇₈ von 1.6 wurden die Zellen geerntet und gewaschen. Das Zellpellet wurde in 100 mM Phosphat-Puffer (pH von 7.4) suspendiert und nach Zugabe von jeweils 50 mM Pyruvat und zusätzlich 50 mM Arginin oder 50 mM Nitrat oder keine weiteren Zusätze 25 Stunden anaerob inkubiert.

Eine Zellsuspension von *P. aeruginosa* wurde unter anaeroben Bedingungen mit Pyruvat und dem externen Elektronenakzeptor Nitrat inkubiert. Durch die einsetzende Denitrifizierung von *P. aeruginosa* ist das Nitrat (50 mM) bereits innerhalb der ersten drei Stunden komplett in Nitrit umgewandelt worden. Dies konnte anhand der Absorption im Photo-Diodenarray der HPLC nachgewiesen werden. Nach sechs Stunden ist das gebildete Nitrit vollständig zum Stickstoff reduziert worden. Obwohl von Anfang an auch gleichzeitig die Pyruvat-Konzentration sinkt, können innerhalb der ersten drei Stunden keine Fermentationsprodukte nachgewiesen werden (siehe Abb. 24 b). Nur Acetat wird kurzzeitig in geringer Konzentration angesammelt. Dies könnte auf einen Overflow-Metabolismus hindeuten, wie er z.B. für *E. coli* beschrieben worden ist (Xu *et al.*, 1999). Nach drei Stunden anaerober Inkubation wird Pyruvat langsamer verbraucht und dabei komplett in Lactat, Acetat und Succinat umgewandelt. Von diesem Zeitpunkt an deutet alles auf eine normale, wenngleich verlangsamte Pyruvat-Fermentation in *P. aeruginosa* hin, was durch Vergleich mit dem parallel verlaufenden Kontrollexperiment ohne Nitrat-Zugabe zu erkennen ist (vergleiche Abb. 24 a mit Abb. 24 b).

Eine weitere Zellsuspension von *P. aeruginosa* wurde unter anaeroben Bedingungen mit Pyruvat (50 mM) und dem fermentierbaren Substrat Arginin (50 mM) inkubiert. Dabei wurde Pyruvat von Beginn an komplett in die typischen Fermentationsprodukte umgewandelt. Durch die gleichzeitig stattfindende Fermentation von Arginin, bei der als Produkte Ornithin, Kohlendioxid und Ammoniak gebildet werden, war der pH-Wert des Medium aber bereits nach 4.5 Stunden trotz Phosphat-Puffer auf 8.0 gestiegen. Von diesem Zeitpunkt an verlief die

Fermentation von Pyruvat durch *P. aeruginosa* nur noch sehr langsam und nicht das gesamte zugegebene Pyruvat wurde in die Produkte überführt (siehe Abb. 24 c). Dieses Ergebnis stimmt mit dem Experiment überein, bei dem der Einfluss des pH-Wertes auf die Pyruvat-Fermentation getestet wurde (siehe Abb. 23). Dort wurde bereits gezeigt, dass bei einem äußeren pH-Wert von 8.0 die Fermentation von Pyruvat in *P. aeruginosa* fast vollständig zum Erliegen kommt (Abb. 23 e).

Diese Experimente sind ein erster Hinweis darauf, dass die beiden Fermentationswege mit den Substraten Pyruvat und Arginin in *P. aeruginosa* parallel ablaufen. Dagegen wird während der Nitrat-Atmung Pyruvat zwar verbraucht, aber keine Fermentationsprodukte gebildet. Lactat, Acetat und Succinat häufen sich erst im Medium an, wenn kein Nitrat mehr vorhanden ist.

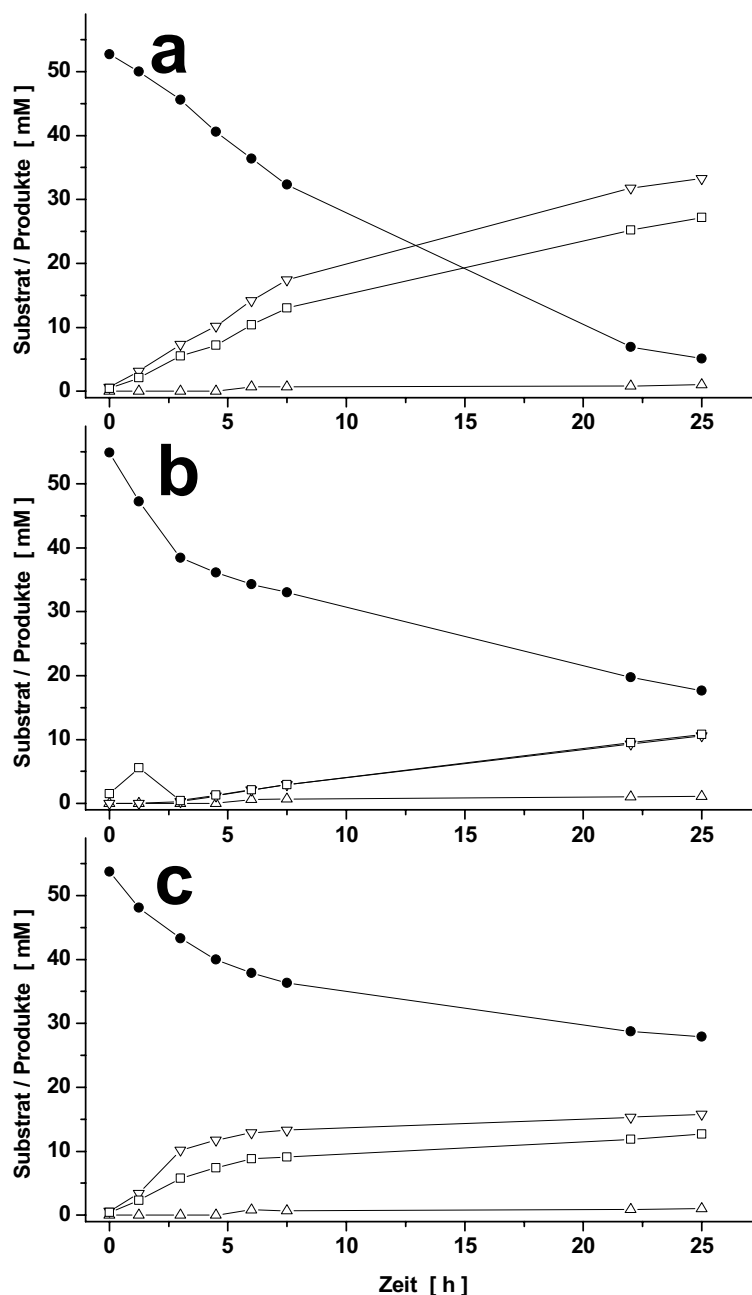


Abb. 24 Analyse der Kombination von Pyruvat-Fermentation mit der Arginin-Fermentation sowie der Nitrat-Atmung. Gezeigt sind die HPLC-Analysen der Kulturüberstände von *P. aeruginosa* Wildtyp, welche als „resting cells“-Ansätze 25 Stunden in 100 mM Phosphat-Puffer (bei pH 7.4) mit 50 mM Pyruvat (a), mit 50 mM Pyruvat und zusätzlich 50 mM Nitrat (b) sowie mit 50 mM Pyruvat und zusätzlich 50 mM Arginin (c) im anaeroben Milieu inkubiert wurden.

Es wurden zu den angegebenen Zeiten steril Proben entnommen und die Kulturüberstände mit HPLC analysiert. Es zeigt sich eine Abnahme der Pyruvat-Konzentration (●-) bei gleichzeitiger Zunahme der Konzentrationen von Lactat (▽-), Acetat (□-) und Succinat (△-) im Puffer. Die Prozesse der Nitrat-Atmung und der Pyruvat-Fermentation laufen nicht gleichzeitig ab. Erst wenn das gesamte Nitrat in Stickstoff umgewandelt ist, wird Pyruvat in die Fermentationsprodukte überführt (b). Im Gegensatz dazu können die Arginin- und die Pyruvat-Fermentation von *P. aeruginosa* kombiniert werden (c). Erst wenn durch die Abbauprodukte von Arginin der pH des Mediums einen Wert von 8 überschreitet, kommt die Pyruvat-Fermentation zum Erliegen.

3.3.11 Einfluss der Häm-Biosynthese auf die Pyruvat-Fermentation in *Pseudomonas aeruginosa*

Die Hämbiosynthese in *P. aeruginosa* wird auf Ebene der Expression der Gene *hemA*, *hemF* und *hemN* durch den Sauerstoffpartialdruck und die Nitratkonzentration im Wachstumsmedium reguliert. Dabei sind die Regulatoren Anr/Dnr, NarXL und IHF beteiligt (Rompf *et al.*, 1998; Krieger *et al.*, 2002). Um den Einfluss der zellulären Hämkonzentration auf die Pyruvat-Fermentation zu untersuchen, wurde eine Häm-auxotrophe *hemA*-Mutante konstruiert.

3.3.11.1 Konstruktion einer *hemA*-Mutante

Für die Konstruktion der *hemA*-Mutante PAO-ME2 wurde eine analoge Strategie wie für den mutierten *pta*-Locus benutzt (siehe Kap. 3.3.4.1.1). Sie führte zur Deletion eines 69 bp langen DNA-Fragmentes aus dem *hemA*-Gen (Nukleotide 825 - 894) an den beiden natürlich vorhandenen *SalI*-Schnittstellen bei gleichzeitiger Insertion einer Gentamycin-Resistenzkassette. Die experimentellen Details sind unter 2.7.2.3 beschrieben. Der gesamte Ablauf der *cross-over*-Ereignisse bei der Herstellung der *P. aeruginosa hemA*-Mutante ist in Abb. 25 schematisch dargestellt.

Die Gentamycin-resistenten und Carbenicillin-sensitiven Kolonien wurden mittels Kolonie-PCR nochmals verifiziert und konnten als *hemA*-Deletionsmutanten mit richtig insertierter Gm-Kassette identifiziert werden, wie unter 2.7.2.3 beschrieben ist.

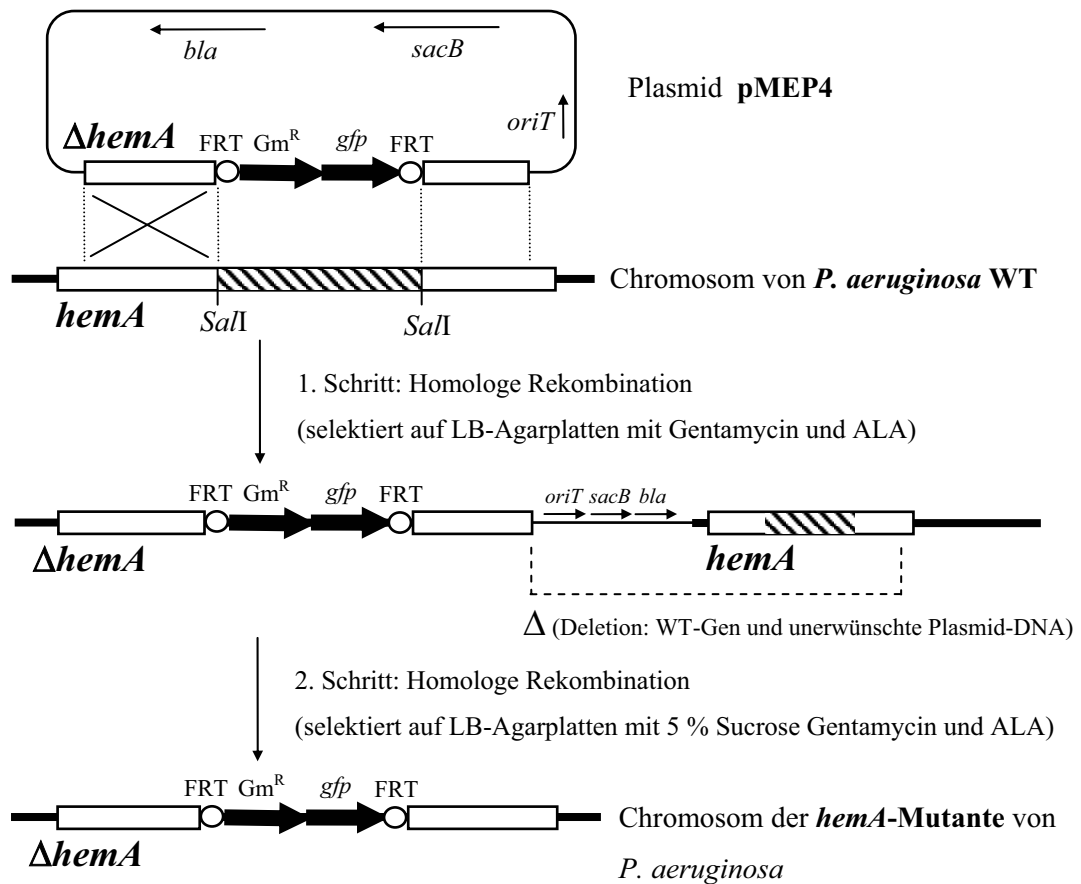


Abb. 25 Schema der Doppelrekombination zwischen dem Plasmid pMEP4 und dem *P. aeruginosa*-Chromosom, welche zum Knockout des Gens *hemA* führt (modifiziert nach Hoang *et al.*, 1998).

Nach dem 1. Schritt der homologen Rekombination, auf den durch Kultivierung auf LB-Agarplatten mit Gentamycin und 5-Aminolävulinsäure selektiert wurde, ist der *suicide*-Vektor pMEP4 in das *P. aeruginosa*-Chromosom integriert worden. Die erhaltenen Zellen wurden anschließend im 2. Schritt auf LB-Agarplatten mit Gentamycin, ALA und Sucrose ausgestrichen, um auf chromosomale *hemA*-Mutanten von *P. aeruginosa* zu selektieren. Das Genprodukt von *sacB* bildet aus Sucrose ein für *P. aeruginosa* toxisches Produkt. Deshalb können nur diejenigen Zellen wachsen, bei denen das *sacB*-Gen mit der gesamten unerwünschten Plasmid-DNA und dem *hemA*-WT-Gen durch eine 2. homologe Rekombination aus dem Chromosom deletiert worden ist. Das Ergebnis dieser Doppelrekombination ist, dass die Nukleotide 825 - 894 (schraffierter DNA-Bereich) des *hemA*-Gens im *P. aeruginosa* WT durch die DNA-Kassette FRT-Gm^R-*gfp*-FRT in der *hemA*-Mutante ersetzt wurden.

FRT – Bindestelle für die FLP-Rekombinase; Gm^R – Gentamycin-Resistenzkassette; *gfp* – kodiert für *green fluorescent protein*; *hemA* – kodiert für Glutamyl-tRNA Reduktase; *sacB* – kodiert für Levansucrase; *bla* – kodiert für β -Lactamase; *oriT* – *origin of transfer*.

3.3.11.2 Anaerobe Inkubation der *hemA*-Mutante mit Pyruvat

Auch die *P. aeruginosa hemA*-Mutante wurde auf ihre Fähigkeit getestet, anaerob in der Anwesenheit von Pyruvat zu überleben. Die Mutante wurde analog zu den Versuchen in Kap. 3.3.5 aerob in OS-Minimalmedium mit 50 µg/ml 5-Aminolävulinsäure kultiviert, zentrifugiert und danach wurde das Zellpellet gewaschen. Anschließend wurden die Pellets sofort in OS-Medium mit 2.5 g/l Hefeextrakt suspendiert und bei einer OD₅₇₈ von ungefähr 0.3 unter anaeroben Bedingungen mit 20 mM Pyruvat (ohne ALA-Zugabe) inkubiert. Die Lebendzellzahlen wurden mit der CFU-Methode bestimmt und HPLC-Analysen von den Kulturüberständen durchgeführt, wie für den Wildtyp unter 3.3.2.1 und 3.3.3.1 beschrieben ist.

Es konnten keine Unterschiede beim Vergleich der CFU-Kurven (siehe Abb. 19 in Kap. 3.3.5) und den HPLC-Ergebnissen (vergleiche Abb. 20 a mit Abb. 20 f in Kap. 3.3.5) zwischen der Häm-auxotrophen *hemA*-Mutante und dem *P. aeruginosa* Wildtyp entdeckt werden. Dieses Ergebnis zeigt, dass für eine funktionierende Pyruvat-Fermentation in *P. aeruginosa* keine Neu-Synthese von Häm-Kofaktoren stattfinden muss.

3.3.12 Experimentell verifiziertes Modell einer anaeroben Pyruvat-Fermentation in *Pseudomonas aeruginosa*

Das anhand der BLAST-Analysen aufgestellte erste Modell einer Glucose-Fermentation in *P. aeruginosa* (siehe Abb. 10 in Kap. 3.2) muss nach den bisherigen experimentellen Ergebnissen, die hier nochmals kurz zusammengefasst sind, korrigiert werden:

- Weder Glucose noch Gluconat als einzige C-Quelle im anaeroben Milieu führte zur Bildung von Fermentationsprodukten.
- Der Umsatz von Acetyl-CoA über Acetyl-Phosphat zu Ethanol wurde nicht beobachtet.
- Die Beteiligung der Gene *pta* und *ldhA* wurde nachgewiesen.
- Während der *ldhA*-Locus unabhängig vom Sauerstoffpartialdruck exprimiert wird, konnte eine ungefähr 5-fache Sauerstoffpartialdruck-abhängige Induktion der *pta-ackA* Expression gezeigt werden. Diese wird durch den Redoxregulator Anr und den *integration host factor* (IHF) vermittelt.
- Die Ansäuerung des Mediums durch die gebildeten Fermentationsprodukte inhibiert die Substratumsetzung nicht.

Das verbesserte Modell für die neue entdeckten Pyruvat-Fermentationswege in *P. aeruginosa* ist in Abb. 26 dargestellt.

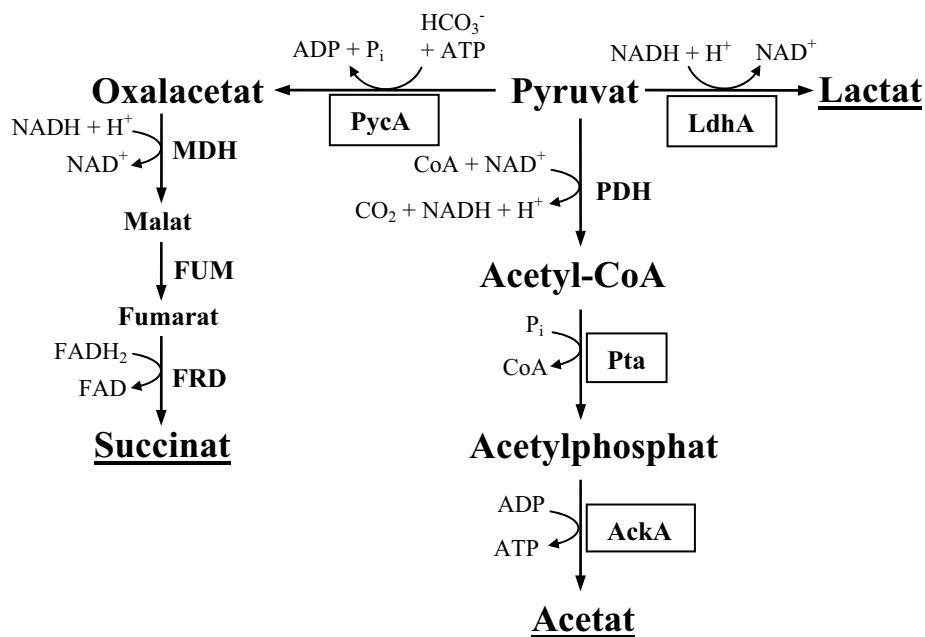


Abb. 26 Experimentell verifiziertes Modell der Pyruvat-Fermentationswege in *P. aeruginosa*.

Die durch HPLC-Analysen nachgewiesenen Fermentationsprodukte sind unterstrichen und die von neu identifizierten Genen abgeleiteten fermentativen Enzyme sind eingerahmt.

PycA, Pyruvat-Carboxylase; LdhA, NAD⁺-abhängige Lactat-Dehydrogenase; PDH, Pyruvat-Dehydrogenase; Pta, Phosphotransacetylase; AckA, Acetatkinase; Enzyme aus dem reduktiven Citratzyklus-Halbkreis: MDH, Malat-Dehydrogenase; FUM, Fumarase; FRD, Fumarat-Reduktase.

3.4 Identifizierung Anr-regulierter Gene in *Pseudomonas aeruginosa* mit Hilfe der Proteomanalyse

Das Fnr-Homolog Anr aus *P. aeruginosa* ist der Hauptregulator, um Gene zu aktivieren, deren Genprodukte unter anaeroben Bedingungen benötigt werden (siehe Kap. 1.4.1). Mit klassischen molekularbiologischen Methoden konnten bisher nur wenige Anr-abhängige Gene experimentell in *P. aeruginosa* identifiziert werden. Dazu gehören die Gene des Arginin Deiminase-Operons (*arcDABC*, Galimand *et al.*, 1991), die Denitrifikationsgene (*narGHI*, Krieger, 2001), die Gene der Cyanogenese (*hcnABC*, Zimmermann *et al.*, 1991) und einige Gene der Hämbiosynthese (*hemA*, Krieger *et al.*, 2002; *hemN* und *hemF*, Rompf *et al.*, 1998).

Im Folgenden wurde nun mit der vergleichenden 2-D Gelelektrophorese ein globaler Ansatz gewählt, um möglichst viele vom Anr-Regulator abhängige Gene bzw. deren Genprodukte gleichzeitig zu identifizieren. Dazu wurden die Proteinmuster von *P. aeruginosa* Wildtyp und der *anr*-Mutante unter aeroben und anaeroben Bedingungen in LB-Vollmedium auf 2-D Gelen untersucht und verglichen.

3.4.1 Proteinmuster von *Pseudomonas aeruginosa* Wildtyp und der *anr*-Mutante unter aeroben und anaeroben Bedingungen

3.4.1.1 Anzucht und Ernte der Zellen

Die Anzucht der Zellen erfolgte in LB-Medium, wie in Kap. 2.8.1 beschrieben. In das Medium für anaeroben Bedingungen wurde 5 g/l Kaliumnitrat dazu gegeben, welches einer Konzentration von 50 mM Nitrat entspricht. Von allen Bedingungen wurden jeweils zwei voneinander unabhängige Kulturen hergestellt. Die aeroben Kulturen der *P. aeruginosa anr*-Mutante wurden aus einer aeroben Übernachtskultur mit einer OD₅₇₈ von 0.03 gestartet und bis zu einer OD₅₇₈ von 0.4 für ungefähr 2 Stunden bei 37 °C und 200 rpm kultiviert. Die anaeroben Kulturen des *P. aeruginosa* Wildtyps wurden aus einer aeroben Übernachtskultur mit einer OD₅₇₈ von 0.03 in Anaerobflaschen angesetzt und bis zum Erreichen der gewünschten OD₅₇₈ von 0.4 für ungefähr 5 Stunden unter Sauerstoffausschluss inkubiert. Die anaeroben Kulturen der *P. aeruginosa anr*-Mutante wurden dagegen aus einer aeroben Übernachtskultur mit einer höheren OD₅₇₈ von 0.1 in Anaerobflaschen angesetzt und bis zum Erreichen der maximalen OD₅₇₈ von 0.2 für ungefähr 12 Stunden unter Sauerstoffausschluss inkubiert. Das bedeutet, dass sich die Zellen der *anr*-Mutante im anaeroben Milieu nur einmal

innerhalb von 12 Stunden teilen. Aus diesem Grund war keine anaerobe Kultivierung mit mehreren Zellteilungen wie beim Wildtyp möglich. Dieser Wachstumsdefekt der *P. aeruginosa anr*-Mutante im anaeroben Milieu ist bereits in der Literatur beschrieben worden (Galimand *et al.*, 1991). Anhand dieses Phänotyps wurde der Anr-Regulator in *P. aeruginosa* entdeckt. Die Ernte der Zellen erfolgte, wie unter 2.8.1 beschrieben. Die Zellsedimente wurden in Kalium-Phosphat-Puffer resuspendiert und in 1 ml Aliquots bei -80 °C gelagert.

3.4.1.2 Zellaufschluss, Proteinfällung und Proteinbestimmung

Die Proteinmenge der geernteten Zellen wurde anhand der bei -80 °C gelagerten 60 µl Aliquots mit dem BCA-Proteintest (siehe 2.8.3.1) bestimmt. Daraus konnte die Menge an Rehydratisierungslösung-a berechnet werden, die zur Rehydratisierung der jeweiligen Proteinextrakte benötigt wurden (siehe Tab. 15).

Von den aerob und den anaerob angezogenen Zellen wurden jeweils 940 µl der bei -80 °C gelagerten Zellsuspensionen mit heißem Phenol aufgeschlossen und die Proteine gefällt, wie unter 2.8.2 beschrieben. Die Proteinsedimente wurden in soviel Rehydratisierungslösung-a resuspendiert, dass sich jeweils eine Konzentration von 2 mg/ml ergab.

Tab. 15 Ergebnisse der BCA-Proteinbestimmung und Berechnung der Menge an Rehydratisierungslösung-a, um eine Konzentration von 2 mg/ml zu erhalten.

	Wildtyp anaerob		<i>anr</i> -Mutante anaerob		<i>anr</i> -Mutante aerob	
	1	2	1	2	1	2
Proteinkonzentration der Zellsuspension [mg/ml]	1.61	1.72	1.66	1.76	1.27	1.45
Proteinmenge [mg] im 940 µl Aliquot	1.51	1.62	1.56	1.65	1.19	1.36
Menge [µl] an Rehydratisierungslösung-a	755	810	780	825	595	680
Proteinmenge [µg] in 250 µl Rehydratisierungslösung-a	500	500	500	500	500	500

3.4.1.3 2-D Gele

Jeweils 500 µg Gesamtprotein in 250 µl der Rehydratisierungslösung-a aus 3.4.1.2 wurden mit 100 µl Rehydratisierungslösung-b vermischt und darin die IPG-Streifen inkubiert, wie unter 2.8.4.1 beschrieben. Die isoelektrische Fokussierung und die anschließende SDS-PAGE mit 10 %igen Gelen wurden durchgeführt, wie in den Abschnitten 2.8.4 bis 2.8.5 beschrieben. Es wurden 17 cm lange pH-Gradientenstreifen mit einem pH-Bereich von pH 5 bis pH 8 der Firma Biorad (Ready Strip™, IPG-Streifen) verwendet. Nach der SDS-PAGE wurden die Gele mit dem Fluoreszenzfarbstoff RuBPS gefärbt (siehe 2.8.7.1) und im Fluoreszenzscanner Molecular Imager (Biorad) eingescannt. Dabei wurde die Intensitätseinstellung „*Low Sample Intensity*“ des Lasers gewählt. Von jedem der drei unterschiedlichen Zustände (*P. aeruginosa* im anaeroben Milieu, *anr*-Mutante im aeroben und anaeroben Milieu) ist beispielhaft ein digitalisiertes Bild der 2-D Gele in Abb. 27, Abb. 28 und Abb. 29 gezeigt. Die Fluoreszenzfärbung hat den Vorteil, dass sie im Vergleich zu den verbreiteten Proteinfärbungen mit Silbernitrat oder Coomassie den größten dynamischen Bereich beim Verhältnis Farbintensität zu Proteinmenge besitzt, welcher über 4 Größenordnungen linear ist. Allerdings sind die mit einem Fluoreszenzfarbstoff (z.B. RuBPS) angefärbten Proteine im sichtbaren Licht auf dem Gel nicht zu erkennen. Aus diesem Grund wurden nach dem Scannen die Gele noch zusätzlich mit kolloidalem Coomassie Brilliant Blue nach der Methode von Neuhoff *et al.* (1988) angefärbt, wie unter 2.8.7.2 beschrieben.

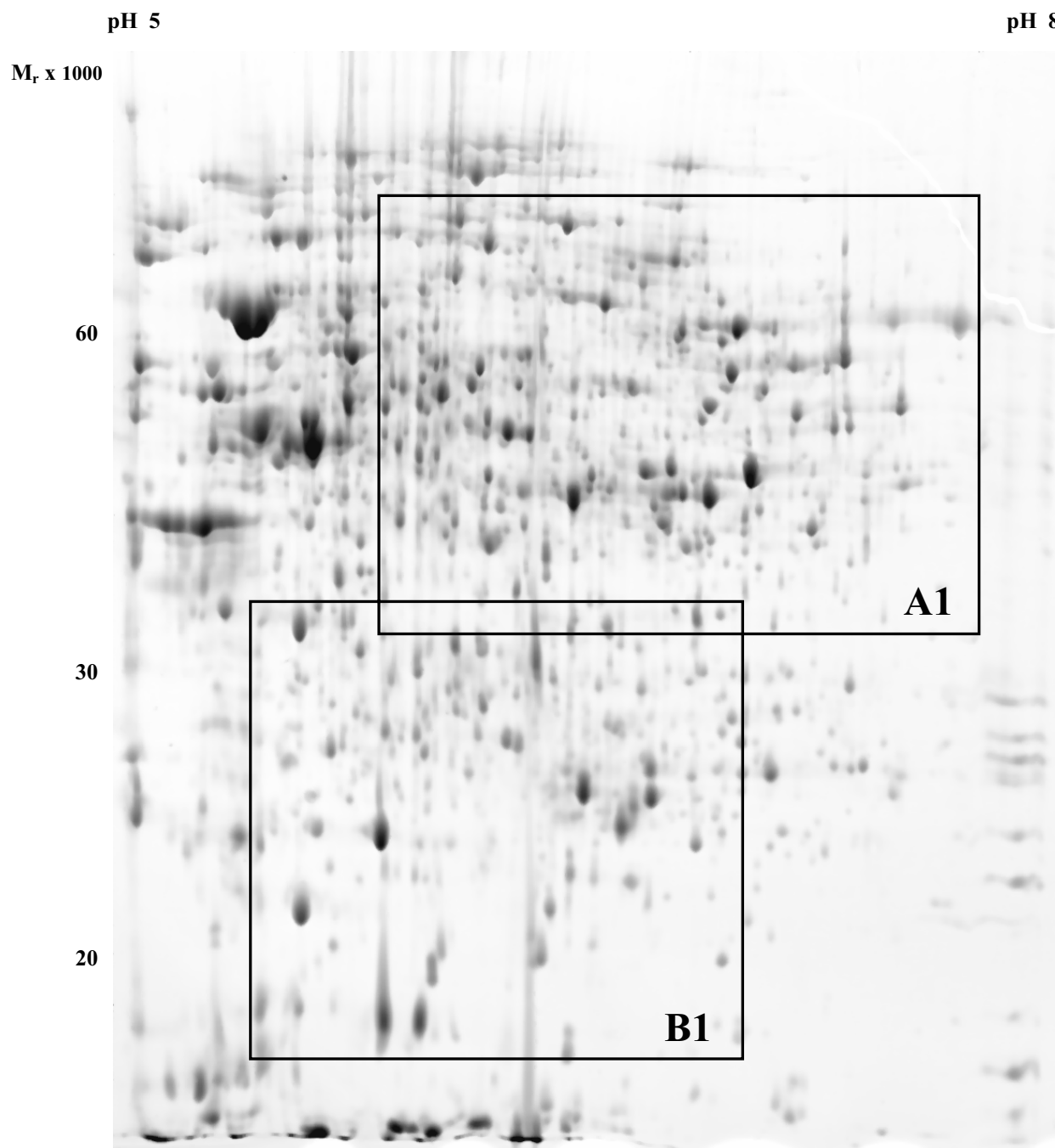


Abb. 27 Digitalisiertes Bild eines mit RuBPS gefärbten 2-D Gels. Die aufgetrennten Proteine stammen aus einer anaeroben *P. aeruginosa* Kultur.

Die Anzucht erfolgte in LB-Medium mit Zusatz von Nitrat, wobei die Zellen bei einer erreichten OD₅₇₈ von 0.4 geerntet wurden. 500 µg Gesamtprotein wurden für die 1. Dimension in IPG-Streifen (pH 5-8, linearer pH-Gradient) mit 110 kVh isoelektrisch fokussiert. Die 2. Dimension wurde in einem 10 %igen SDS-Polyacrylamidgel durchgeführt. Senkrecht sind die relativen molekularen Massen der benutzten Markerproteine angezeigt, während waagerecht der untersuchte pH-Bereich indiziert ist.

A1 und B1 sind Bildausschnitte, die in Abb. 31 und Abb. 32 zum besseren Vergleich mit anderen Gelbildausschnitten vergrößert dargestellt sind.

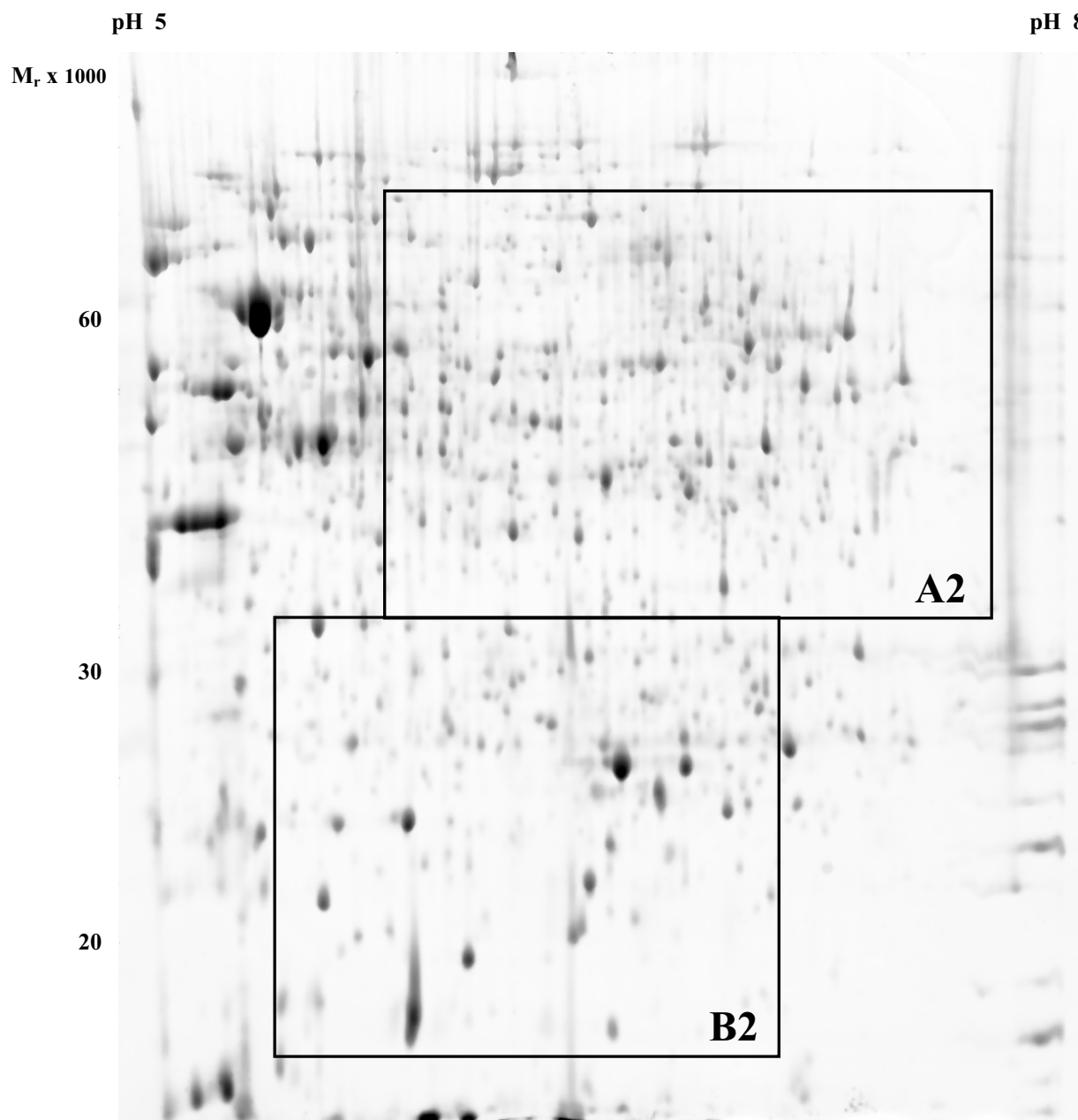


Abb. 28 Digitalisiertes Bild eines mit RuBPS gefärbten 2-D Gels. Die aufgetrennten Proteine stammen aus einer aeroben Kultur der *P. aeruginosa anr*-Mutante.

Die Anzucht erfolgte in LB-Medium, wobei die Zellen bei einer erreichten OD₅₇₈ von 0.4 geerntet wurden. 500 µg Gesamtprotein wurden für die 1. Dimension in IPG-Streifen (pH 5-8, linearer pH-Gradient) mit 110 kVh isoelektrisch fokussiert. Die 2. Dimension wurde in einem 10 %igen SDS-Polyacrylamidgel durchgeführt. Senkrecht sind die relativen molekularen Massen der benutzten Markerproteine angezeigt, während waagrecht der untersuchte pH-Bereich indiziert ist.

A2 und B2 sind Bildausschnitte, die in Abb. 31 und Abb. 32 zum besseren Vergleich mit anderen Gelbildausschnitten vergrößert dargestellt sind.

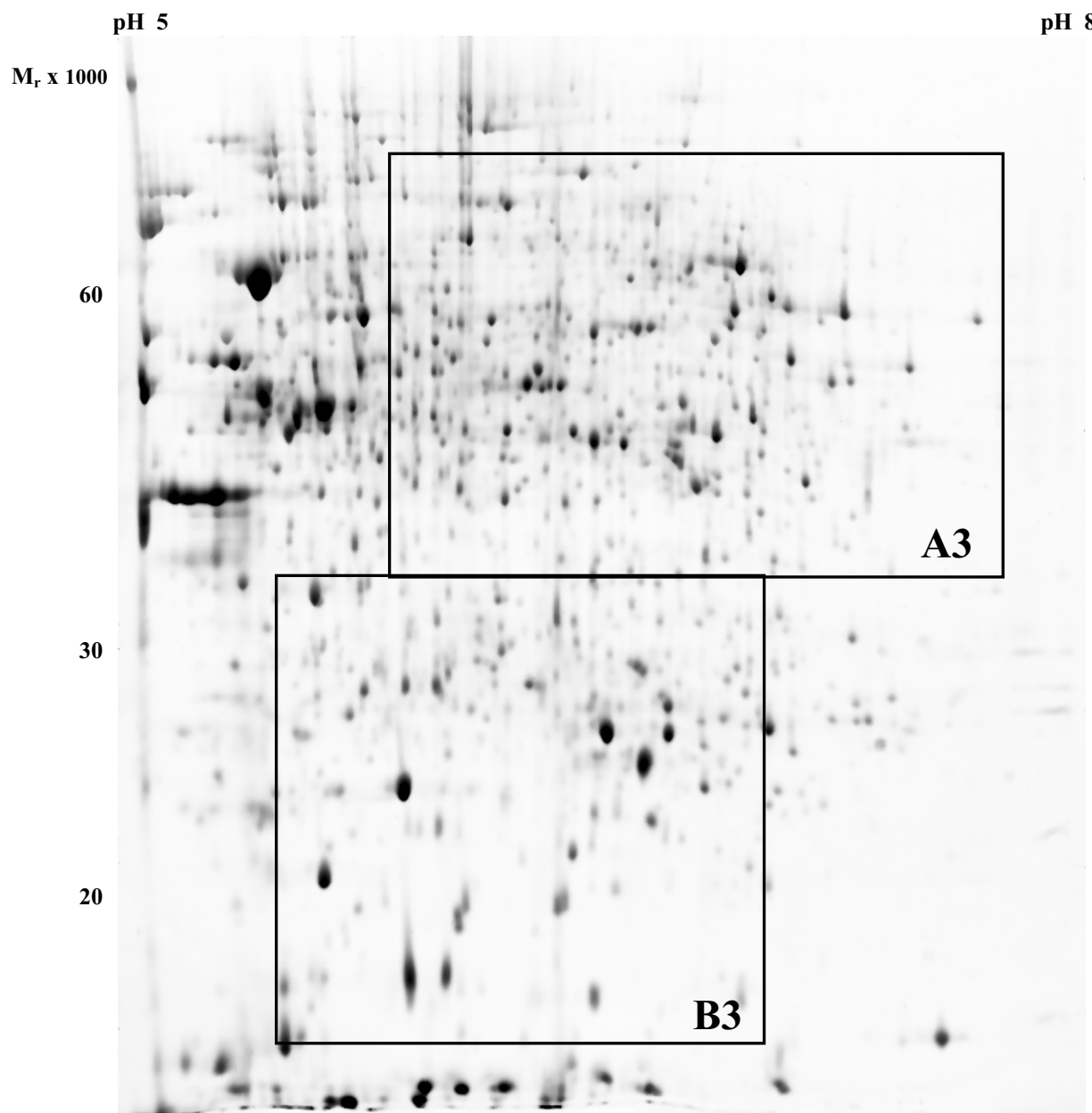


Abb. 29 Digitalisiertes Bild eines mit RuBPS gefärbten 2-D Gels. Die aufgetrennten Proteine stammen aus einer anaeroben Kultur der *P. aeruginosa anr*-Mutante.

Die Anzucht erfolgte in LB-Medium mit Zusatz von Nitrat, wobei die Zellen bei einer erreichten OD₅₇₈ von 0.2 geerntet wurden. 500 µg Gesamtprotein wurden für die 1. Dimension in IPG-Streifen (pH 5-8, linearer pH-Gradient) mit 110 kVh isoelektrisch fokussiert. Die 2. Dimension wurde in einem 10 %igen SDS-Polyacrylamidgel durchgeführt. Senkrecht sind die relativen molekularen Massen der benutzten Markerproteine angezeigt, während waagerecht der untersuchte pH-Bereich indiziert ist.

A3 und B3 sind Bildausschnitte, die in Abb. 31 und Abb. 32 zum besseren Vergleich mit anderen Gelbildausschnitten vergrößert dargestellt sind.

3.4.1.4 Auswertung und Vergleich der 2-D Gele

Die Auswertung der Gele erfolgte sowohl visuell als auch computerunterstützt mit dem Programm Z3 (Compugen), wie unter 2.8.8 beschrieben. Zur Abschätzung der Reproduzierbarkeit wurden zuerst jeweils zwei Gele des gleichen Zustandes miteinander verglichen. Die digitalisierten Bilder der beiden Gele wurden mit Hilfe der Z3-Software übereinander gelegt (das so genannte „matchen“), wobei das eine Gelbild im Computer grün und das andere rot eingefärbt wurde. Als Beispiel sind in Abb. 30 die übereinander gelegten Bilder der Gele von der *P. aeruginosa anr*-Mutante unter anaeroben Bedingungen gezeigt. Grüne Signale entsprechen den Proteinen, die nur aus der einen Kultur und rote Signale denen, die nur aus der anderen Kultur extrahiert worden waren. Proteine, die in den beiden unabhängig voneinander kultivierten Bakterien präsent waren, sind schwarz eingefärbt. Bei der Betrachtung der beiden übereinander gelegten Replikat-Gelbilder in Abb. 30 wird die hohe Reproduzierbarkeit aller Schritte dieses Experimentes von der Proteinextraktion aus den Zellen über die 2-D Gelelektrophorese bis zur Proteinfärbung im Gel deutlich. Die wenigen Proteine, die nur in einem der beiden Gel-Replikate präsent waren (d.h. die in Abb. 30 als grüne oder rote Spots erscheinen), wurden bei der weiteren Analyse nicht mit berücksichtigt.

Ein detaillierter Vergleich der Proteinmuster wurde durch direkte Gegenüberstellung von Ausschnittsvergrößerungen der 2-D Bilder aus Abb. 27, Abb. 28 und Abb. 29 erhalten. In Abb. 31 sind die einander entsprechenden Bereiche A1, A2 und A3 und in Abb. 32 sind die Bereiche B1, B2 und B3 aus den drei gezeigten Gelbildern dargestellt.

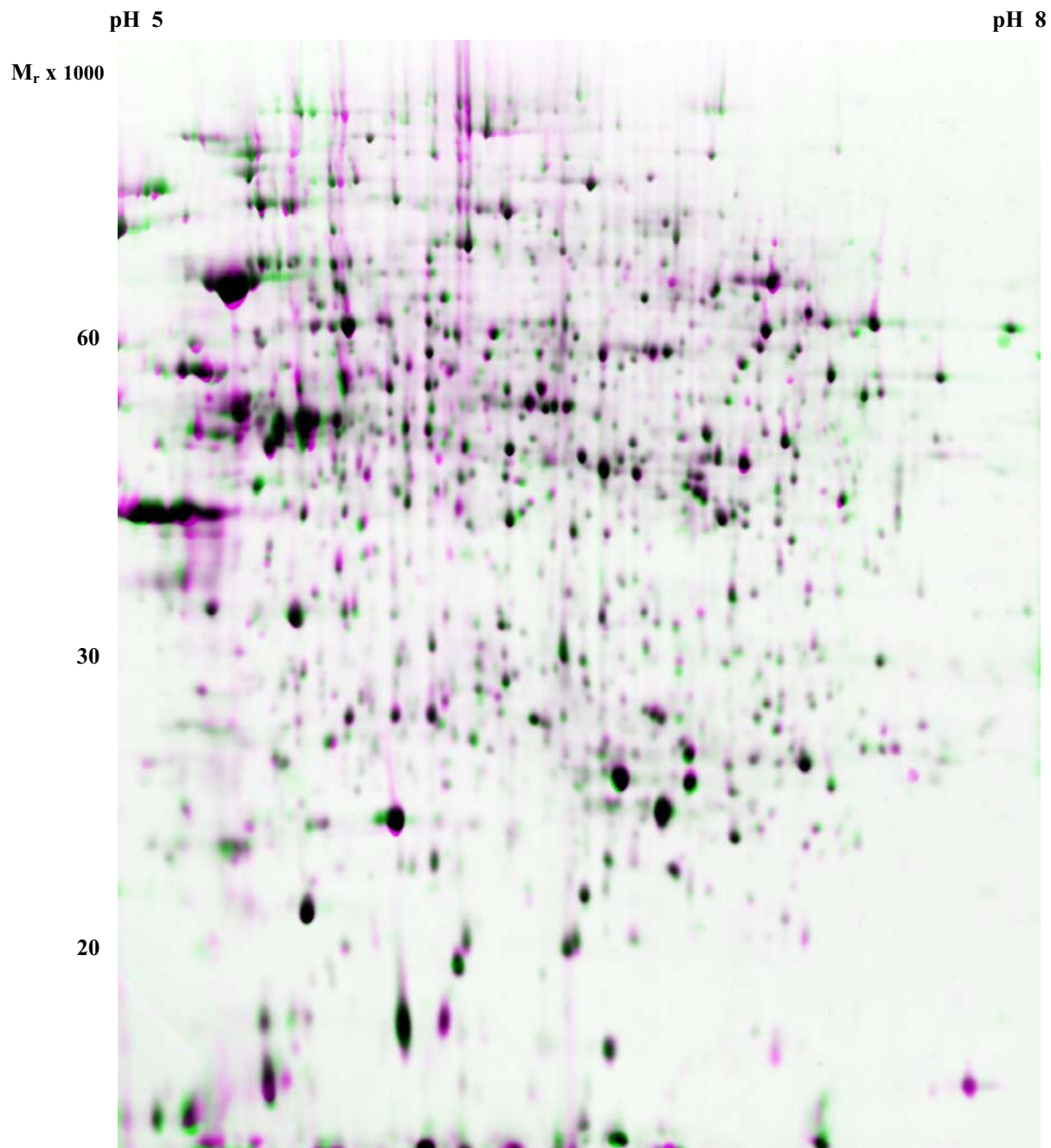


Abb. 30 Ergebnis des Vergleichs der beiden 2-D Gele, die die Proteinmuster von den zwei unabhängig voneinander unter anaeroben Bedingungen in LB-Medium kultivierten *P. aeruginosa* *anr*-Mutanten zeigen.

Auf dem einen digitalisierten Bild wurden die Signale der Proteine automatisch von der Z3-Software grün und auf dem anderen Bild rot eingefärbt. Danach wurden die beiden Bilder durch den Z3-Algorithmus so übereinander gelegt, dass sich möglichst viele Übereinstimmungen der Proteinspots ergaben (schwarz dargestellt). Durch dieses Verfahren konnten Inhomogenitäten in den beiden Gel-Elektrophoresen ausgeglichen werden.

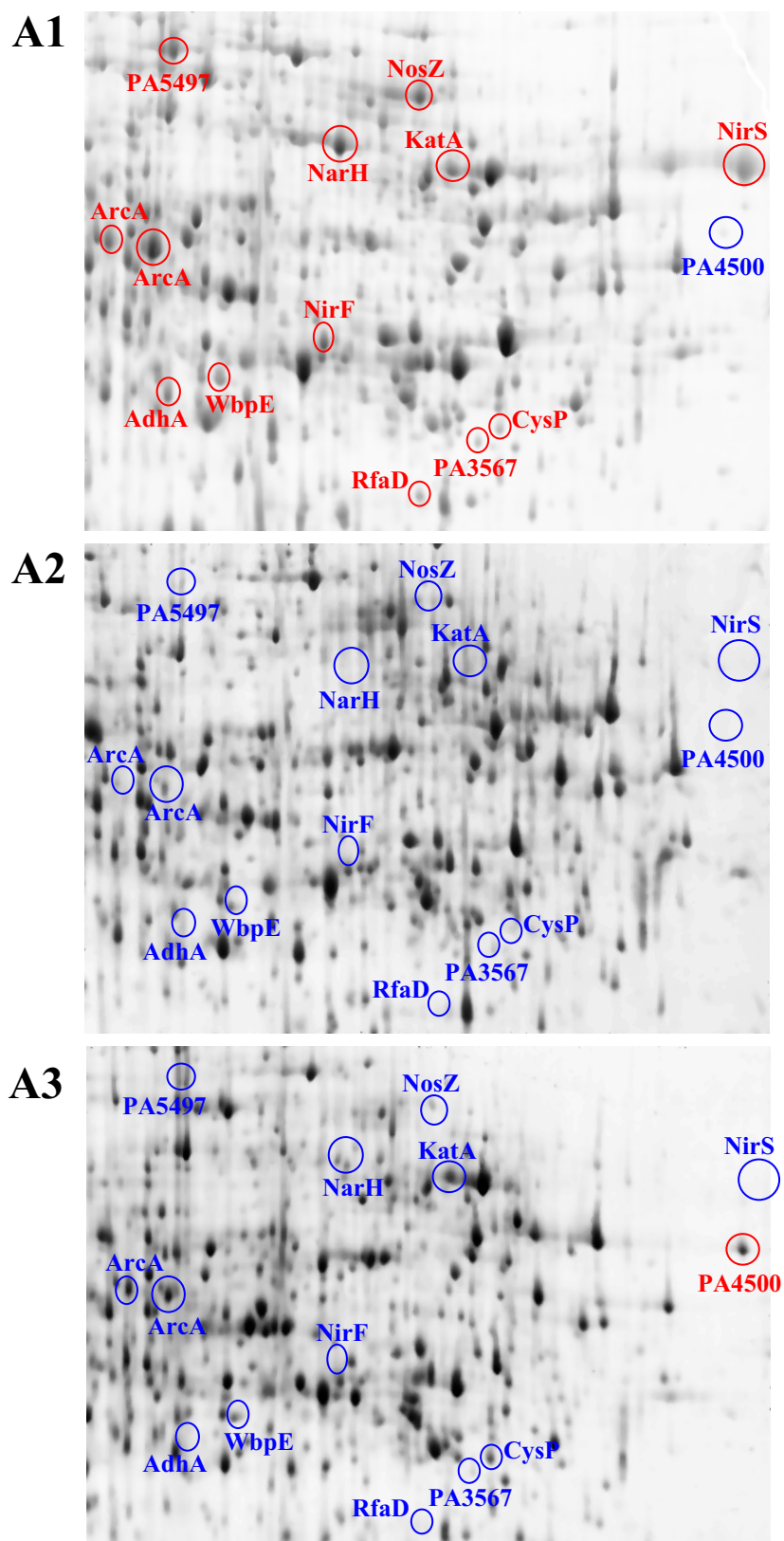


Abb. 31 Vergleich vergrößerter Ausschnitte aus den 2-D Gelen, deren aufgetrennte Proteine aus einer anaeroben Kultur des *P. aeruginosa* Wildtyps (A1), aus einer aeroben Kultur der *anr*-Mutante (A2) sowie aus einer anaeroben Kultur der *anr*-Mutante (A3) extrahiert wurden.

Der Bereich A1 zeigt einen Bildausschnitt des 2-D Gels aus Abb. 27. Der Bereich A2 zeigt einen Bildausschnitt des 2-D Gels aus Abb. 28. Der Bereich A3 zeigt einen Bildausschnitt des 2-D Gels aus Abb. 29. Rot dargestellt sind diejenigen differenziell produzierten Proteine, die aus den Gelen isoliert wurden und durch MALDI-MS identifiziert werden konnten.

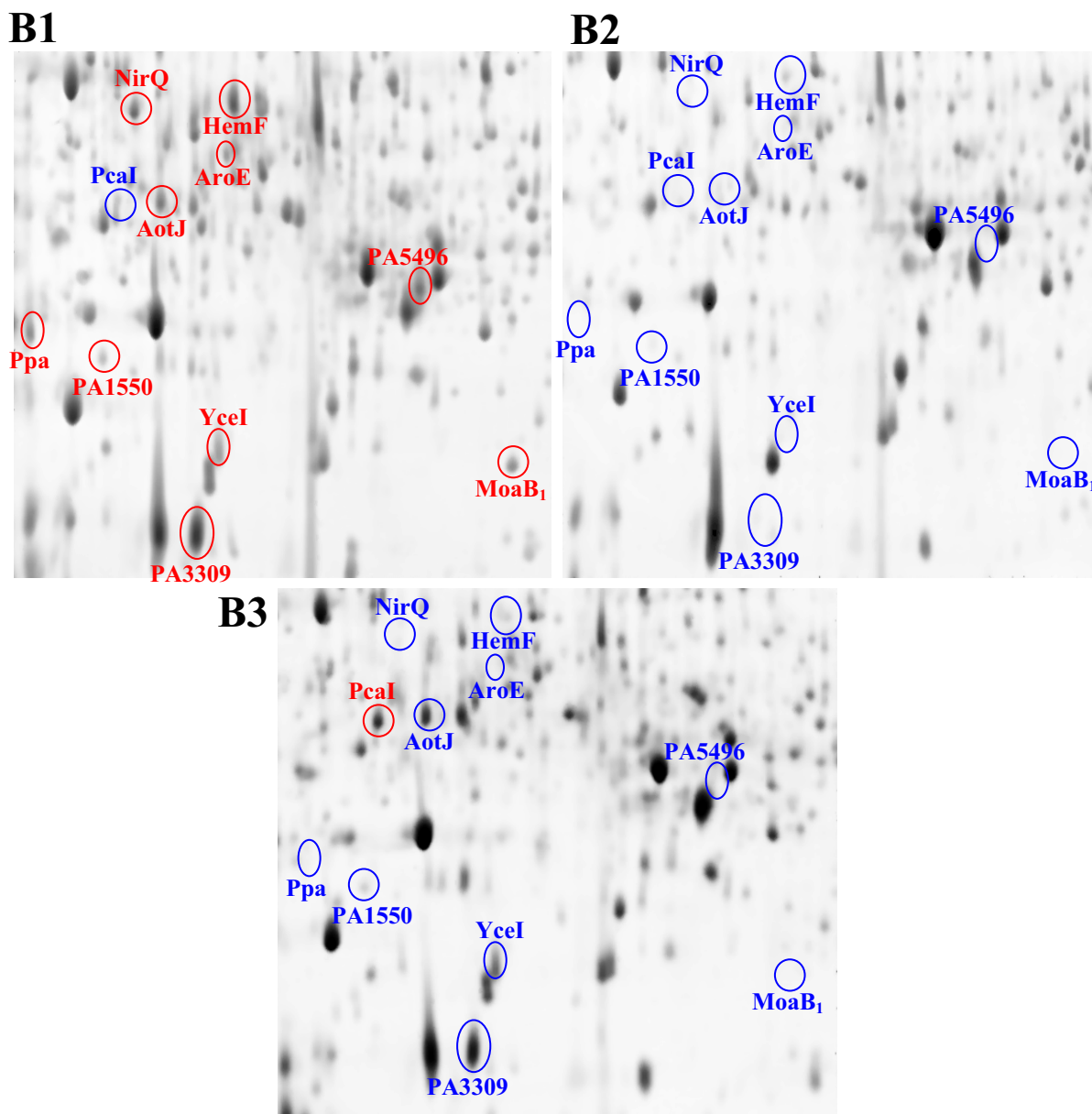


Abb. 32 Vergleich vergrößerter Ausschnitte aus den 2-D Gelen, deren aufgetrennte Proteine aus einer anaeroben Kultur des *P. aeruginosa* Wildtyps (B1), aus einer aeroben Kultur der *anr*-Mutante (B2) sowie aus einer anaeroben Kultur der *anr*-Mutante (B3) extrahiert wurden.

Der Bereich B1 zeigt einen Ausschnitt des 2-D Gels aus Abb. 27. Der Bereich B2 zeigt einen Ausschnitt des 2-D Gels aus Abb. 28. Der Bereich B3 zeigt einen Ausschnitt des 2-D Gels aus Abb. 29. Rot dargestellt sind diejenigen differentiell produzierten Proteine, die aus den Gelen isoliert wurden und durch MALDI-MS identifiziert werden konnten.

Die interessanten, differentiell produzierten Proteine wurden aus den 2-D Gelen der Proteinextrakte von anaeroben Zellen ausgestochen. Damit wurde jeweils ein tryptischer „in Gel“-Verdau der Proteine durchgeführt, wie unter 2.8.9.1 beschrieben. Nach dem Aufreinigen der Peptide über ZipTips (siehe unter 2.8.9.2) wurden die fertigen Proben zur MALDI-TOF-Analyse gegeben. In der Tab. 16 sind nur die eindeutig identifizierten der differentiell produzierten Proteine mit der Lokalisierung ihrer korrespondierenden Gene im Genom von *P. aeruginosa* aufgeführt. Außerdem sind die theoretischen Werte der Molekulargewichte und der isoelektrischen Punkte aller identifizierten Proteine den experimentell bestimmten gegenüber gestellt. In der Tabelle sind dabei die englischen Enzymnamen aufgelistet, während im laufenden Text die deutschen Bezeichnungen verwendet werden.

Durch den Vergleich des theoretischen mit dem experimentell bestimmten Molekulargewicht eines Proteins kann leicht erkannt werden, ob es sich bei dem im 2-D Gel aufgetrennten Protein um das gesamte Protein mit kompletter Aminosäuresequenz oder um eine verkürzte Version (Abbauprodukt) handelt. Bei letzterem könnte z.B. ein proteolytischer Verdau infolge einer möglichen Regulation stattgefunden haben. Wenn allerdings zu viele Proteine in verkürzter Form im Gel aufgetrennt werden, dann deutet dies eher auf einen allgemeinen Stresszustand der Zelle oder sogar auf einen unspezifischen proteolytischen Verdau durch die Lyse der Zellen bei der Probenvorbereitung hin. Anhand der Werte in Tab. 16 ist zu sehen, dass die experimentell bestimmten Werte für die Molekulargewichte der Proteine mit den theoretisch berechneten sehr gut übereinstimmen.

Die Ursachen für eine Abweichung des experimentell bestimmten pI-Wertes vom theoretisch berechneten pI-Wert sind vielfältiger und daher schwierig voneinander zu unterscheiden. Als denkbarer Grund für eine Änderung des pI-Wertes könnte ein kurzes Signalpeptid vom Prä-Protein abgetrennt worden sein. Alternativ dazu könnten eine oder mehrere posttranslationale Modifikationen eingefügt worden sein, welche die Gesamtnettoladung des Proteins verändern (z.B. eine negativ geladene Phosphatgruppe).

Als genereller Trend ist zu erkennen, dass die experimentell bestimmten pI-Werte 0.5 bis 0.9 pH-Einheiten größer sind als die theoretisch berechneten pI-Werte. Dieses Phänomen war bei 22 von den insgesamt 27 untersuchten Proteinen zu beobachten. Eine mögliche Erklärung wäre, dass der pH-Gradient (pH 5-8) der verwendeten IPG-Streifen nicht die vom Hersteller angegebene Linearität aufwies. Zum Teil waren die experimentell bestimmten pI-Werte der analysierten Proteine aber auch kleiner als die theoretisch berechneten pI-Werte, z.B. bei den Nummern 262, 274, 276 und 278. Dies deutet auf eine oder mehrere der oben beschriebenen

posttranslationalen Modifikationen hin. Zwei der analysierten Proteine (Nr. 267 und 268) migrierten auf dem SDS-PAGE-Teil des 2-D Gels mit gleicher Geschwindigkeit, hatten dabei aber unterschiedliche pI-Werte. Mit der MALDI-TOF-Analyse wurden diese beiden unterschiedlich aufgetrennten Proteine (Nr. 267 und 268) dennoch dem gleichen Enzym zugeordnet, nämlich der Arginin Deiminase. Hier ist es sehr wahrscheinlich, dass dieses Protein nach der Translation modifiziert wurde und deshalb in zwei unterschiedlichen Formen mit verschiedenen isoelektrischen Punkten vorliegt.

Tab. 16 Proteine, die während der Kultivierung des *P. aeruginosa* Wildtyps und der *anr*-Mutante differentiell produziert wurden.

Die Proteine von Interesse wurden nach ihrem tryptischen Verdau mittels Massenspektrometrie und Datenbankvergleich identifiziert. Es wurden die theoretischen Werte der Molekulargewichte und der isoelektrischen Punkte aller identifizierten Proteine den experimentell bestimmten gegenüber gestellt. Weiterhin ist zu jedem Protein der korrespondierende Genname und der Genlocus anhand der Bezeichnung des *P. aeruginosa*-Genomprojektes (die so genannte PA-Nummer) angegeben.

Spot -Nr.	Proteinname	MW _{th} ¹ [kDa]	MW _{ex} ² [kDa]	pI _{th} ¹	pI _{ex} ²	Gen (Genlocus)
239	hypothetical protein	16.5	18	5.3	6.0	- (PA3309)
240	hypothetical protein	20.8	20	6.1	6.1	<i>yceI</i> (PA0423)
241	molybdopterin biosynthetic protein B ₁	19.7	20	6.5	7.0	<i>moaB₁</i> (PA3915)
244	anthranilate dioxygenase small subunit	19.3	18	6.8	7.6	<i>antB</i> (PA2513)
249	maleylacetoacetate isomerase	23.7	25	6.4	7.1	<i>maiA</i> (PA2007)
250	hypothetical protein	24.9	25	6.0	6.7	- (PA5496)
252	hypothetical protein	20.3	20	5.1	5.7	- (PA1550)
253	inorganic pyrophosphatase	19.4	20	4.8	5.5	<i>ppa</i> (PA4031)
256	shikimate dehydrogenase	29.5	30	5.4	6.1	<i>aroE</i> (PA0025)
257	regulatory protein NirQ	28.9	30	5.1	5.8	<i>nirQ</i> (PA0520)
258	coproporphyrinogen III oxidase, aerobic	34.8	30	5.5	6.1	<i>hemF</i> (PA0024)
260	ADP-L-glycero-D-mannoheptose 6-epimerase	37.4	35	6.1	6.8	<i>rfaD</i> (PA3337)
261	probable oxidoreductase	36.7	40	6.1	7.0	- (PA3567)
262	sulfate-binding protein of ABC transporter	36.5	40	8.3	7.1	<i>cysP</i> (PA1493)
263	heme d ₁ biosynthesis protein NirF	43.3	40	6.1	6.6	<i>nirF</i> (PA0516)
265	probable aminotransferase WbpE	38.9	40	5.7	6.3	<i>wbpE</i> (PA3155)
266	alcohol dehydrogenase	35.9	40	5.5	6.1	<i>adhA</i> (PA5427)
267	arginine deiminase	46.4	50	5.4	6.1	<i>arcA</i> (PA5171)
268	arginine deiminase	46.4	50	5.4	6.0	<i>arcA</i> (PA5171)
269	catalase	55.6	60	6.2	6.9	<i>katA</i> (PA4236)
270	respiratory nitrate reductase beta chain	58.1	60	5.7	6.6	<i>narH</i> (PA3874)
271	nitrous-oxide reductase precursor	70.6	70	6.0	6.9	<i>nosZ</i> (PA3392)
272	hypothetical protein	82.7	80	5.7	6.3	- (PA5497)
274	arginine/ornithine binding protein	28.0	30	6.8	5.9	<i>aotJ</i> (PA0888)
275	probable CoA transferase, subunit A	25.2	25	5.1	5.8	<i>pcaI</i> (PA1999)
276	probable binding protein component of ABC transporter	59.7	60	8.6	7.8	- (PA4500)
278	nitrite reductase precursor	62.6	60	8.3	7.8	<i>nirS</i> (PA0519)

¹ MW_{th} – theoretisches Molekulargewicht; pI_{th} – theoretischer pI-Wert. Beide Werte wurden aus der PRODORIC-Datenbank übernommen.

² MW_{ex} – experimentell bestimmtes Molekulargewicht; pI_{ex} – experimentell bestimmter pI-Wert. Beide Werte wurden auf den digitalisierten Bildern der experimentellen 2-D Gele bestimmt.

3.4.1.5 Zuordnung der identifizierten Proteine in Klassen mit gleichem Regulationsmuster

In der Tab. 17 wurden die identifizierten, differentiell produzierten Proteine anhand ihrer relativen Proteinmengen innerhalb der untersuchten Wachstumsbedingungen qualitativ geordnet. Weder mit dem Programm Z3 noch mit PDQuest konnten die Proteinverhältnisse in den verschiedenen 2-D Gelen untereinander verlässlich bestimmt werden. Weil darüber hinaus nur jeweils zwei Replikate pro Zustand analysiert wurden, wurde auf eine Darstellung mit den exakten Daten der Proteinmengen verzichtet.

Die Proteine wurden in drei Gruppen eingeteilt (siehe Tab. 17): Die erste Gruppe beinhaltet die nur im *P. aeruginosa* Wildtyp unter anaeroben Bedingungen produzierten Proteine, Gruppe 2 umfasst alle Anr-unabhängig anaerob produzierten Proteine und in Gruppe 3 sind die nur in der *anr*-Mutante im anaeroben Milieu synthetisierten Proteine.

In Kap. 3.4.1.6 wurden die Promotorbereiche der zu diesen Proteinen gehörenden Genloci nach möglichen Bindestellen für den Sauerstoff-Regulator Anr untersucht. Dabei wurde die Einteilung in die drei Gruppen beibehalten.

Tab. 17 Einordnung der identifizierten Proteine in Gruppen mit vergleichbarem Regulationsmuster anhand der jeweiligen relativen Proteinmenge auf den verschiedenen 2-D Gelen.

Die relative Proteinmenge wurde in vier Stufen angegeben: (0) kein Protein im Gel sichtbar; schwach (+), mittel (++) und stark (+++) produziertes Protein.

Spot-Nr.	Proteinname	cl ¹	relative Proteinmenge		
			Wildtyp	anr-Mutante	
			anaerob	anaerob	aerob
263	heme d ₁ biosynthesis protein (NirF)	1	++	0	0
257	regulatory protein (NirQ)	1	++	0	0
278	nitrite reductase precursor (NirS)	1	++	0	0
241	molybdopterin biosynthetic protein B ₁ (Moab ₁)	2	+	0	0
258	coproporphyrinogen III oxidase, aerobic (HemF)	2	++	0	0
253	inorganic pyrophosphatase (Ppa)	2	++	0	0
270	respiratory nitrate reductase beta chain (NarH)	2	++	0	0
271	nitrous-oxide reductase precursor (NosZ)	2	++	0	0
256	shikimate dehydrogenase (AroE)	2	+	0	0
266	alcohol dehydrogenase (AdhA)	2	+	0	0
260	ADP-L-glycero-D-mannoheptose 6-epimerase (RfaD)	2	+	0	0
261	probable oxidoreductase (PA3567)	3	+	0	0
265	probable aminotransferase (WbpE)	3	+	0	0
272	hypothetical protein (PA5497)	4	+	0	0
250	hypothetical protein (PA5496)	4	+	0	0
267	arginine deiminase (ArcA)	1	++	++	0
268	arginine deiminase (ArcA)	1	+++	++	0
274	arginine/ornithine binding protein (AotJ)	1	++	++	0
269	catalase (KatA)	1	+	+	0
262	sulfate-binding protein of ABC transporter (CysP)	2	+	+	0
252	hypothetical protein (PA1550)	4	+	+	0
239	hypothetical protein (PA3309)	4	+++	+++	0
240	hypothetical protein (YceI)	4	+	+	0
249	maleylacetoacetate isomerase (MaiA)	2	0	+	0
244	anthranilate dioxygenase small subunit (AntB)	2	0	++	0
275	probable CoA transferase, subunit A (PcaI)	3	0	++	0
276	probable binding protein component of ABC transporter (PA4500)	3	0	++	0

¹ cl – Der *confidence level* gibt die Qualität der verfügbaren Informationen über das entsprechende Protein an (Daten entnommen aus der aktuellen Annotierungsdatenbank des Genomsequenzierungsprojektes: www.pseudomonas.com): level 1 – Funktion experimentell in *P. aeruginosa* nachgewiesen; level 2 – Funktion eines Proteins aus einem anderen Organismus mit sehr hoher Sequenzidentität zum entsprechenden Protein in *P. aeruginosa* nachgewiesen; level 3 – Funktion aufgrund konservierter Aminosäuren, struktureller Eigenschaften oder begrenzter Sequenzidentität zu bekannten Proteinen postuliert; level 4 – Funktion unbekannt.

3.4.1.6 Untersuchung der Promotorbereiche der identifizierten Gene auf mögliche Bindestellen des Anr-Regulators

Die stromaufwärts gelegenen Bereiche (potentielle Promotorbereiche) aller im *P. aeruginosa* Wildtyp und der *anr*-Mutante differentiell exprimierten Gene wurden nach möglichen Anr-Bindestellen untersucht. Dabei kam das „*Weight Matrix Search*“-Programm der PRODORIC-Datenbank unter Verwendung der Anr-Matrix (siehe Tab. 18) zum Einsatz, wie in Kap. 2.11.2 beschrieben (Münch *et al.*, 2003).

Tab. 18 Anr-Matrix aus 11 verschiedenen experimentell untersuchten Anr-abhängigen Genen (Tabelle modifiziert nach der Abbildung auf der PRODORIC-Internetseite „<http://prodoric.de>“).

Aus den verschiedenen Anr-Bindemotiven ist die Konsensussequenz abgeleitet, welche für die Suche nach unbekannten Anr-Bindestellen vom Programm „*Weight Matrix Search*“ verwendet wird.

	Summe der jeweilige Nukleotide an der Position													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
A	0	0	0	7	0	2	0	1	3	7	1	0	11	9
C	1	0	0	2	7	4	3	3	4	0	0	11	0	0
G	0	0	11	0	0	3	3	7	3	4	0	0	0	2
T	10	11	0	2	4	2	5	0	1	0	10	0	0	0
Summe	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11
Konsensus ^{1,3}	T	T	G	M	Y	N	B	S	N	R	T	C	A	A
Konsensus ^{2,3}	T	T	G	M	Y	V	K	S	V	R	T	C	A	R

¹ aus der Matrix berechnete Konsensussequenz

² für die Suche benutzte Konsensussequenz

³ nach der UIPAC-Nomenklatur für Nukleotidsäuresequenzen (Cornish-Bowden; 1985): **B** = C,G,T; **K** = G,T; **M** = A,C; **R** = A,G; **S** = G,C; **V** = A,C,G; **Y** = C,T; **N**=A,C,G,T

In Tab. 19 (Kap. 3.4.1.6.1), Tab. 20 (Kap. 3.4.1.6.2) und Tab. 21 (Kap. 3.4.1.6.3) sind die Ergebnisse der nach möglichen Anr-Bindestellen untersuchten verschiedenen Promotorbereiche zusammengefasst.

3.4.1.6.1 Im *P. aeruginosa* Wildtyp unter anaeroben Bedingungen induzierte Gene

Tab. 19 Mögliche Bindestellen für den Anr-Regulator in den stromaufwärts gelegenen Regionen aller identifizierten Gene, die im *P. aeruginosa* WT unter anaeroben Bedingungen induziert sind.

Es ist jeweils die prozentuale Identität der identifizierten möglichen Bindestellen mit der Anr-Konsensussequenz (siehe Tab. 18) der Anr-Matrix angegeben. Zusätzlich wurde der Abstand der möglichen Anr-Bindestellen zum Translationsstart des gesamten Genlocus ausgerechnet. Falls die Gene bereits experimentell untersucht worden sind, ist die zugehörige Literaturstelle angegeben.

Spot-Nr.	Proteinname	Gen (gesamtes Operon)	Sequenz der Anr-Bindestelle	Identität mit Anr-Konsensussequenz (Position vor Startkodon)
257	regulatory protein NirQ	<i>nirQ</i> (<i>nirQOP</i>)	TTGACcg gaATCAA ¹	99 % (79-92 bp vor <i>nirQ</i>)
271	nitrous-oxide reductase precursor	<i>nosZ</i> (<i>nosRZDFYL</i>)	TTGACtt tcATCAA ²	96 % (120-133 bp vor <i>nosR</i>)
258	coproporphyrinogen III oxidase, aerobic	<i>hemF</i> (<i>hemF-aroE</i>)	TTGACgg ccGTCAA ³	95 % (93-106 bp vor <i>hemF</i>)
256	shikimate dehydrogenase	<i>aroE</i> (<i>hemF-aroE</i>)	TTGACgg ccGTCAA ³	95 % (93-106 bp vor <i>hemF</i>)
270	respiratory nitrate reductase beta chain	<i>narH</i> (<i>narK₁K₂GHJI</i>)	TTGATtc ctATCAA ⁴	94 % (63-76 bp vor <i>narK₁</i>)
278	nitrite reductase precursor	<i>nirS</i> (<i>nirSMCFDLGHJEN</i>)	TTGATtc cgGTCAA ⁵	92 % (124-137 bp vor <i>nirS</i>)
263	heme d ₁ biosynthesis protein NirF	<i>nirF</i> (<i>nirSMCFDLGHJEN</i>)	TTGATtc cgGTCAA ⁵	92 % (124-137 bp vor <i>nirS</i>)
260	ADP-L-glycero-D-mannoheptose 6-epimerase	<i>rfaD</i> (<i>rfaD</i>)	TTGTTgc agGTCAA	89 % (54-67 bp vor <i>rfaD</i>)
266	alcohol dehydrogenase	<i>adhA</i> (<i>adhA</i>)	TTGCCgc aaCTCAA	87 % (137-150 bp vor <i>adhA</i>)
272	hypothetical protein	PA5497 (PA5497-PA5496)	TTGATtc ccGTCAG	86 % (15-28 bp vor PA5497)
250	hypothetical protein	PA5496 (PA5497-PA5496)	TTGATtc ccGTCAG	86 % (15-28 bp vor PA5497)
261	probable oxidoreductase	PA3567 (<i>ycnE</i> -PA3567)	TTGAAat agCCCAT	73 % (30-43 bp vor <i>ycnE</i>)
265	probable aminotransferase WbpE	<i>wbpE</i> (<i>wbpABCDE</i>)	TTGTGcg gtCGCAG	71 % (34-47 bp vor <i>wbpA</i>)
241	molybdopterin biosynthetic protein B ₁	<i>moaB₁</i> (<i>moaCDEB₁A₁</i>)	ATGTata caATCAT	70 % (87-100 bp vor <i>moaC</i>)
253	inorganic pyrophosphatase	<i>ppa</i> (<i>ppa</i>)	keine	< 70 %

¹ Anr-Bindestelle publiziert in Arai *et al.* (1994).

² Dnr-Bindestelle publiziert in Arai *et al.* (2003).

³ Anr-Bindestelle publiziert in Rompf *et al.* (1998).

⁴ Anr-Bindestelle von R. Krieger untersucht worden (Krieger, 2001).

⁵ Anr/Dnr-Bindestelle publiziert in Arai *et al.* (1994) und Kawasaki *et al.* (1997).

Im *P. aeruginosa* Wildtyp sind unter anaeroben Bedingungen vor allem diejenigen Gene induziert, deren Genprodukte für die anaerobe Respiration oder Fermentation benötigt werden (siehe Tab. 19). Dabei handelt es sich neben den Enzymen, die an den eigentlichen Energie liefernden Reaktionen beteiligt sind, auch um die Enzyme für die Biosynthese benötigter Kofaktoren.

Die membrangebundene Nitratreduktase (NarGHI) katalysiert den ersten Schritt der anaeroben Nitrat-Respiration in *P. aeruginosa* (siehe Abb. 33 und Kap. 1.2). Von R. Krieger aus unserer Arbeitsgruppe konnte bereits eine Anr-Bindestelle 34-47 bp vor dem Transkriptionsstartpunkt des zugehörigen *narK₁K₂GHJI*-Operons identifiziert werden (Krieger, 2001). Die Untereinheiten der membrangebundenen Nitratreduktase (NarGHI) enthalten mehrere Häm-Gruppen und zwei Molybdopterin-Guanin-Dinukleotide als Kofaktoren (siehe Kap. 1.2). Die sauerstoffunabhängige Coproporphyrinogen III Oxidase (HemF) ist ein wichtiges an der Häm-Biosynthese beteiligtes Enzym. Die experimentelle Untersuchung der Promotorsequenz des Operons *hemF-aroE* in unserer Arbeitsgruppe ergab, dass sich 38-51 bp vor dem Transkriptionsstartpunkt dieses Operons eine Anr-Bindestelle befindet (Rompf *et al.*, 1998). Die Shikimat Dehydrogenase (AroE) wird vermutlich hauptsächlich deshalb unter anaeroben Bedingungen verstärkt produziert, weil das zugehörige Gen sich im gleichen Operon befindet wie *hemF*. Das Enzym MoaB₁ ist an der Biosynthese von Molybdopterin beteiligt, welches als Vorläufermolekül für die beiden Molybdopterin-Guanin-Dinukleotid-Kofaktoren der NarG-Untereinheit der Nitratreduktase fungiert. Tatsächlich konnte im Promotorbereich des Genlocus *moaCDEB₁A₁* eine Anr-Bindestelle identifiziert werden (siehe Tab. 19).

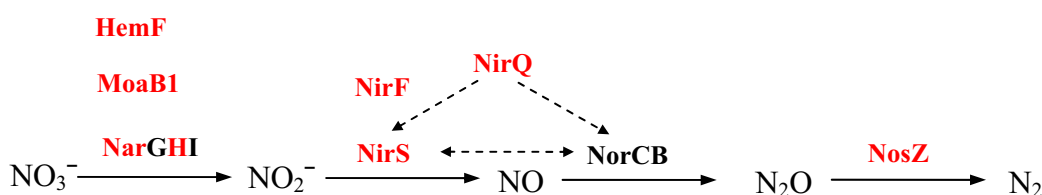


Abb. 33 Enzymreaktionen der Nitratatmung in *P. aeruginosa*.

Rot dargestellt sind die in den 2-D Gelen gefundenen Enzyme (bzw. Untereinheiten), die an der Nitratatmung beteiligt sind.

HemF, Coproporphyrinogen-III-Oxidase (aerob); MoaB₁, Molybdopterin Biosynthese Protein B₁; NarGHI, cytoplasmatische Nitratreduktase; NirF, Häm *d*₁ Biosynthese protein; NirS, respiratorische Nitritreduktase (Hämenzym); NirQ, Regulator Protein; NorCB, NO-Reduktase; NosZ, N₂O-Reduktase.

Die *cd*₁-Nitrit-Reduktase (NirS) katalysiert den 2. Schritt der Nitrat-Respiration (siehe Abb. 33 und Kap. 1.2). Das Enzym NirF ist an der Biosynthese des von NirS benötigten Kofaktors Häm *d*₁ beteiligt. Die Gene (*nirF* und *nirS*) dieser beiden Enzyme befinden sich im *nirSMCFDLGHJEN*-Operon, das die strukturellen Gene für die Biosynthese von Cytochrom *cd*₁ und Häm *d*₁ sowie die restlichen Komponenten der Nitrit-Respiration enthält. Im Promotorbereich dieses Operons befindet sich eine bereits publizierte Anr/Dnr-Bindestelle (Arai *et al.*, 1994; Kawasaki *et al.*, 1997). Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Expression der *nir*-Gene Anr-unabhängig ist und nur der aktive Dnr-Regulator benötigt wird (Arai *et al.*, 1997). Anr ist jedoch an der Expression des *dnr*-Gens beteiligt. Da die beiden Regulatoren Anr und Dnr eine Regulationskaskade bilden, sind alle von Dnr abhängigen Gene auch indirekt Anr-abhängig (Arai *et al.*, 1997). Die gleiche Anr/Dnr-Bindestelle ist in der entgegengesetzten Richtung (auf dem DNA-Gegenstrang) 72-92 bp vom Translationsstartpunkt des *nirQ*-Gens entfernt und reguliert zusätzlich das gesamte *nirQOP*-Operon (Arai *et al.*, 1994). Das Regulationsprotein NirQ ist an der posttranslationalen Aktivierung der Nitritreduktase (NirS) und der NO-Reduktase (NorCB) beteiligt und vermittelt die funktionelle Kopplung dieser beiden Enzyme (siehe gestrichelte Pfeile in Abb. 33; Arai *et al.*, 1996).

Die N₂O-Reduktase katalysiert den letzten Schritt der Nitrat-Respiration (siehe Abb. 33 und Kap. 1.2). Eine Anr/Dnr-Bindestelle, die sich 35-48 bp vor dem Transkriptionsstartpunkt des *nosRZDFYL* Operons befindet, ist bereits publiziert worden (Arai *et al.*, 2003). Wie schon für die *nir*-Gene konnte auch hier nachgewiesen werden, dass die Expression des *nos*-Operons Dnr-abhängig ist und der aktive Anr-Regulator nur indirekt benötigt wird (Arai *et al.*, 2003).

Die Alkohol Dehydrogenase (AdhA) aus *P. aeruginosa*, die eine 73 %ige Sequenzidentität mit der NAD⁺-abhängigen Alkohol Dehydrogenase aus *Bacillus stearothermophilus* besitzt, ist möglicherweise am fermentativen Stoffwechsel unter Sauerstoff-Abschluss beteiligt. Die Promotorsequenz des zugehörigen *adhA*-Gens weist eine Anr-Bindestelle mit hoher Identität zur Anr-Konsensussequenz auf (siehe Tab. 19). Dies unterstützt die Vermutung, dass dieses Gen unter anaeroben Bedingungen exprimiert wird. Im ersten Teil dieser Arbeit (siehe Kap. 3.3.3) konnten unter den dort getesteten Bedingungen allerdings keine Alkohole als Pyruvat-Fermentationsprodukte von *P. aeruginosa* nachgewiesen werden.

Die Oxidoreduktase (PA3567) aus *P. aeruginosa* ist noch nicht experimentell untersucht worden. Das Enzym enthält aber Sequenzmotive, die typisch für Zink-abhängige Alkohol

Dehydrogenasen sind. Stromaufwärts des zugehörigen Genlocus *yce*-PA3567 befindet sich eine mögliche Anr-Bindestelle (siehe Tab. 19).

Weiterhin wurden unter anaeroben Bedingungen sowohl das Enzym ADP-L-Glycero-D-Mannoheptose-6-Epimerase (RfaD) als auch die Aminotransferase WbpE verstärkt synthetisiert, welche beide an der Biosynthese von Lipopolysacchariden (LPS) beteiligt sind. Die im Promotorbereich des *rfaD*-Gens identifizierte Anr-Bindestelle weist eine sehr hohe Sequenzidentität zur Anr-Konsensussequenz auf (siehe Tab. 19). Im Gegensatz dazu konnte stromaufwärts des *wbpABCDE*-Genlocus nur eine mögliche Anr-Bindestelle mit geringer Übereinstimmung gefunden werden.

Zwei auf dem *P. aeruginosa*-Chromosom benachbarte ORFs (PA5496 und PA5497), die beide für hypothetische Proteine mit unbekannter Funktion kodieren, wurden unter anaeroben Bedingungen im Wildtyp, nicht aber in der *anr*-Mutante, exprimiert. In der Tat konnte stromaufwärts dieses möglichen Operons eine Anr-Bindestelle mit sehr hoher Sequenzidentität zur Anr-Konsensussequenz gefunden werden (siehe Tab. 19). Das vom PA5497-Genlocus abgeleitete Protein enthält Sequenzmotive, die typisch für Ribonukleotid-Reduktasen sind. Das andere Protein (PA5496) enthält keine Bereiche, die zu bereits bekannten Sequenzmotiven eine Ähnlichkeit aufweisen.

Das *ppa*-Gen kodiert für die anorganische Pyrophosphatase (Ppa), die allgemein eine wichtige Rolle bei der Biosynthese von Proteinen, RNA und DNA spielt (Lahti *et al.*, 1988). Im möglichen Promotorbereich des *ppa*-Gens von *P. aeruginosa* konnte keine Anr-Bindestelle identifiziert werden (siehe Tab. 19). Zu den Genen, deren Transkription vom Anr-Regulator beeinflusst werden, gehören auch Regulatorgene (z.B. *dnr* und *narL*). Die Genprodukte dieser Regulatorgene sind wiederum an der Expression von weiteren Genen beteiligt. Eine reduzierte Genexpression in der *anr*-Mutante könnte daher nicht nur das Resultat eines fehlenden Anr-Proteins sondern auch eine indirekte Antwort sein.

3.4.1.6.2 Unter anaeroben Bedingungen von Anr unabhängig induzierte Gene

Die Promotorbereiche aller Genloci, deren Genprodukte Anr-unabhängig unter anaeroben Bedingungen produziert werden, wurden auf mögliche Bindestellen für den Anr-Regulator untersucht.

Tab. 20 Mögliche Bindestellen für den Anr-Regulator in den stromaufwärts gelegenen Regionen aller identifizierten Gene, die sowohl im *P. aeruginosa* WT als auch der *anr*-Mutante unter anaeroben Bedingungen induziert sind.

Es ist jeweils die prozentuale Identität der identifizierten möglichen Bindestellen mit der Anr-Konsensussequenz (siehe Tab. 18) der Anr-Matrix angegeben. Zusätzlich wurde der Abstand der möglichen Anr-Bindestellen zum Translationsstart des gesamten Genlocus ausgerechnet. Falls die Gene bereits experimentell untersucht worden sind, ist die zugehörige Literaturstelle angegeben.

Spot-Nr.	Proteinname	Gen (gesamtes Operon)	Sequenz der Anr-Bindestelle	Identität mit Anr-Konsensussequenz (Position vor Startkodon)
267	arginine deiminase	<i>arcA</i> (<i>arcDABC</i>)	TTGACgt ggATCAG ¹	94 % (64-77 bp vor <i>arcD</i>)
268	arginine deiminase	<i>arcA</i> (<i>arcDABC</i>)	TTGACgt ggATCAG ¹	94 % (64-77 bp vor <i>arcD</i>)
239	hypothetical protein	PA3309 (PA3309)	TTGACct ccGGCAA	86 % (85-98 bp vor PA3309)
269	catalase	<i>kata</i> (<i>kata</i>)	TTGTCtt ccGCCAA	83 % (74-87 bp vor <i>kata</i>)
240	hypothetical protein	<i>yceI</i> (PA0422- <i>yceI</i>)	TTCGCct ggTTCAC	71 % (196-209 bp vor PA0422)
262	sulfate-binding protein of ABC transporter	<i>cysP</i> (<i>cysP</i>)	keine	< 70 %
274	arginine/ornithine binding protein	<i>aotJ</i> (<i>aotJQMOPR</i>)	keine	< 70 %
252	hypothetical protein	PA1550 (<i>fixG</i> -PA1550)	keine	< 70 %

¹ Anr-Bindestelle publiziert in Galimand *et al.* (1991) und Gamper *et al.* (1991).

Eine bereits publizierte Anr-Bindestelle befindet sich 35-48 bp vor dem Transkriptionsstartpunkt des *arcDABC*-Operons, das unter anaeroben Bedingungen induziert wird (Mercenier *et al.*, 1980; Galimand *et al.*, 1991; Gamper *et al.*, 1991). Dieses Operon kodiert für die Enzyme der Arginin Deiminase (ArcA), die katabolische Ornithin-Carbamoyl Transferase (ArcB), die Carbamat Kinase (ArcC) und den Arginin-Ornithin Antiporter (ArcD). Die Enzyme ArcA, ArcB und ArcC sind für die Arginin-Fermentation von *P. aeruginosa* verantwortlich (siehe Kap. 1.3.2.2). ArcD transportiert Arginin in die Zelle hinein und gleichzeitig das entstandene Produkt Ornithin wieder aus der Zelle hinaus. In den

hier beschriebenen Experimenten konnte die Arginin Deiminase (ArcA) auf den 2-D Gelen in zwei Proteine mit unterschiedlichen pI-Werten aufgetrennt werden (siehe Abb. 31 in Kap. 3.4.1.4). ArcA wurde dabei sowohl vom *P. aeruginosa* Wildtyp als auch von der *anr*-Mutante im anaeroben Milieu in LB-Medium gebildet. Obwohl auf den 2-D Gelen zu erkennen ist, dass die *anr*-Mutante weniger an Arginin Deiminase produzierte als der Wildtyp, konnte in diesen Experimenten die bereits publizierte starke Anr-Abhängigkeit des *arcDABC*-Operons nur teilweise bestätigt werden (Galimand *et al.*, 1991; Gamper *et al.*, 1991). Ein möglicher Grund dafür wäre, dass unter den hier untersuchten Bedingungen (LB-Medium mit Nitrat) andere Transkriptionsfaktoren die Funktion von Anr bei der Expression dieses Operons übernehmen können. So hat z.B. auch die extrazelluläre Arginin-Konzentration (vermittelt über den Transkriptionsregulator ArgR) einen induzierenden Effekt auf die Expression des *arcDABC*-Operons (Lu *et al.*, 1999).

Auf den 2-D Gelen konnte ein hypothetisches Protein PA3309 identifiziert werden, das unter anaerob denitrifizierenden Bedingungen sowohl im *P. aeruginosa* Wildtyp als auch in der *anr*-Mutante produziert wird. Trotzdem konnte im Promotorbereich des PA3309-Gens eine potentielle Anr-Bindestelle mit hoher Sequenzidentität zur Anr-Konsensussequenz gefunden werden (siehe Tab. 20). Microarray-Experimente, die von Katharina Trunk in unserem Labor durchgeführt wurden, zeigten, dass das PA3309-Gen anaerob 70-fach induziert wird. Das Protein PA3309 ist in mikroaerophilen und anaeroben Biofilmen vorhanden (Hassett *et al.*, 2002). Die Bildung des hypothetischen Proteins PA3309 wird also offensichtlich durch Sauerstoffmangel induziert. Bei BLAST-Analysen wurden Übereinstimmungen zu Domänen aus Proteinen der „universal stress protein family“ gefunden, die sich über die gesamte Aminosäuresequenz des Proteins PA3309 erstrecken. PA3309 aus *P. aeruginosa* besitzt eine 37 %ige Identität zu UspA aus *E. coli*, einem kleinen cytoplasmatischen Protein, dessen Menge unter Stressbedingungen stark zunimmt. UspA erhöht die Überlebensrate der Zellen bei langanhaltendem Stress (Nystrom & Neidhardt, 1994; Freestone *et al.*, 1997). Das Protein PA3309 aus *P. aeruginosa* ist von Kerstin Schreiber im Rahmen ihrer Diplomarbeit näher untersucht worden (Schreiber, 2003).

Die Katalase (KatA) macht das für Bakterienzellen toxische Stoffwechselzwischenprodukt Wasserstoffperoxid unschädlich. Die anaerobe Induktion des *kataA*-Gens von *P. aeruginosa*-Zellen, die sich in der Stationärphase befinden, wurde bereits publiziert (Ma *et al.*, 1999). In den hier beschriebenen 2-D Gelexperimenten wurde die Katalase unter anaeroben Bedingungen Anr-unabhängig produziert. Trotzdem konnte im stromaufwärts gelegenen

Bereich des *katA*-Gens eine Anr-Bindestelle mit hoher Sequenzidentität zur Anr-Konsensussequenz identifiziert werden.

Das Protein YceI aus *P. aeruginosa* besitzt eine hohe Sequenzidentität zum YceI-Protein aus *E. coli*, welches ein im basischen Milieu produziertes periplasmatisches Protein mit unbekannter Funktion ist (Stancik *et al.*, 2002). Stromaufwärts des Genlocus PA0422-*yceI* konnte eine mögliche Anr-Bindestelle mit geringer Übereinstimmung zur Anr-Konsensussequenz identifiziert werden.

Das Arginin-Ornithin Bindeprotein (AotJ) ist das erste Gen im *aotJQMOPR*-Operon. Die Genprodukte dieses Operons bilden einen ATP-Transporter für Arginin und Ornithin. Die Substrate müssen zuerst an das Bindeprotein AotJ gebunden werden, bevor sie in die Zelle transportiert werden können. Bisher konnte experimentell gezeigt werden, dass dieses Operon durch Arginin induziert wird. Das Signal wird dabei wahrscheinlich durch den Regulator ArgR vermittelt (Nishijyo *et al.*, 1998). Das Arginin-Ornithin Bindeprotein (AotJ) wurde in den hier beschriebenen Experimenten unabhängig vom Anr-Regulator unter anaeroben Bedingungen produziert. In Übereinstimmung damit konnte im stromaufwärts gelegenen Bereich des *aotJQMOPR*-Operons keine Anr-Bindestelle identifiziert werden (siehe Tab. 20).

Auch die Gene *cysP* und PA1550 wurden unabhängig von Anr unter anaeroben Bedingungen synthetisiert. In den stromaufwärts gelegenen Bereichen dieser Gene konnten ebenfalls keine Anr-Bindestellen gefunden werden. Das Sulfat-Bindeprotein (CysP) eines ABC Transporters ist am Schwefel-Transport in die Zelle beteiligt. Das hypothetische Protein PA1550 besitzt keine Ähnlichkeit zu bereits bekannten Sequenzmotiven.

3.4.1.6.3 In der *P. aeruginosa* *anr*-Mutante unter anaeroben Bedingungen induzierte Gene

Die Promotorbereiche aller Genloci, deren Genprodukte nur in der *anr*-Mutanten unter anaeroben Bedingungen produziert werden, wurden auf mögliche Bindestellen für den Anr-Regulator untersucht. Diese Art der Regulation bedeutet, dass entweder das Anr-Protein bei diesen Genloci als Repressor wirkt oder aber der beobachtete Effekt nicht mit dem Sauerstoffregulator Anr in Zusammenhang steht.

Tab. 21 Mögliche Bindestellen für den Anr-Regulator in den stromaufwärts gelegenen Regionen aller identifizierten Gene, die nur in der *P. aeruginosa* *anr*-Mutante unter anaeroben Bedingungen induziert sind.

Es ist jeweils die prozentuale Identität der identifizierten möglichen Bindestellen mit der Anr-Konsensussequenz (siehe Tab. 18) der Anr-Matrix angegeben. Zusätzlich wurde der Abstand der möglichen Anr-Bindestellen zum Translationsstart des gesamten Genlocus ausgerechnet. Falls die Gene bereits experimentell untersucht worden sind, ist die zugehörige Literaturstelle angegeben.

Spot-Nr.	Proteinname	Gen (gesamtes Operon)	Sequenz der Anr-Bindestelle	Identität mit Anr-Konsensussequenz (Position vor Startkodon)
276	probable binding protein component of ABC transporter	PA4500 (PA4500)	TTGCCat ggCCCAT	75 % (50-63 bp vor PA4500)
275	probable CoA transferase, subunit A	<i>pcaI</i> (<i>pcaIJ</i>)	keine	< 70 %
249	maleylacetoacetate isomerase	<i>maiA</i> (<i>hmgA-fahA-maiA</i>)	keine	< 70 %
244	anthranilate dioxygenase small subunit	<i>antB</i> (<i>antABC</i>)	keine	< 70 %

Das Protein PA4500 von *P. aeruginosa* besitzt eine hohe Sequenzidentität zu periplasmatischen Dipeptid-Bindeproteinen für ABC-Transporter aus *P. putida* und *P. syringae*. Im stromaufwärts vom PA4500-Gen gelegenen Bereich konnte eine mögliche Anr-Bindestelle mit geringer Identität zur Anr-Konsensussequenz gefunden werden.

Die Anthranilat Dioxygenase (AntABC) katalysiert den oxidativen Abbau von Anthranilat, einem Stoffwechselzwischenprodukt des Tryptophan-Abbaus (Bundy *et al.*, 1998). Das Operon *hmgA-fahA-maiA* kodiert für die Enzyme des Phenylalanin-Abbaus (Fernandez-Canon & Penalava, 1998). Das *pcaIJ*-Operon kodiert für ein Enzym des Benzoat-Abbaus (Parales & Harwood, 1993). Bei allen drei Genloci konnten in den stromaufwärts gelegenen Bereichen keine eindeutigen Anr-Bindestellen identifiziert werden, d.h. die Übereinstimmungen mit der Anr-Konsensussequenz waren zu gering (siehe Tab. 21). Wie

bereits beschrieben gehören zu den Genen, deren Transkription vom Anr-Regulator beeinflusst wird, auch solche Gene, die für weitere Regulatoren kodieren (z.B. Dnr und NarL). Diese Regulatoren sind wiederum an der Expression von weiteren Genen beteiligt. Eine verstärkte Genexpression in der *anr*-Mutante könnte daher nicht nur das Resultat eines fehlenden Anr-Proteins sondern auch eine indirekte Antwort sein. Ausserdem könnte es sich hier um einen Anr-unabhängigen Effekt handeln. Wird die *anr*-Mutante unter anaeroben Bedingungen kultiviert, so bedeutet dies einen Stresszustand für die Zelle. Daher werden mit diesem Versuchsansatz nicht nur von Anr direkt oder indirekt abhängige Gene/Proteine erfasst, sondern auch allgemein Proteine der Stressantwort.

3.4.2 Zusammenfassung der Resultate aus den 2-D Gelexperimenten

Mit dem hier beschriebenen Proteomics-Ansatz wurden 18 Anr-abhängig produzierte Proteine identifiziert. Darunter waren viele in der Literatur zuvor publizierte Enzyme und deren Untereinheiten (NarH, NirS, NirF, NirQ, NosZ, HemF, AroE, ArcA), die an der Nitratatmung und der Arginin-Fermentation beteiligt sind und unter dem Einfluss des Anr-Regulators bzw. des Dnr-Regulators gebildet werden. Gleichzeitig wurden eine Reihe von Anr abhängig synthetisierte Proteine identifiziert (AdhA, MoaB₁, KatA, WbpE, RfaD, PA3309, PA3567, PA4500, PA5496, PA5497), deren entsprechende Gene in den stromaufwärts gelegenen Bereichen bisher unbekannte potentielle Anr-Bindestellen aufwiesen.

4 Zusammenfassung und Ausblick

4.1 Zusammenfassung

Der anaerobe Energiestoffwechsel ist eine der Grundlagen für die Biofilmbildung und die Infektion durch das opportunistisch pathogene Bakterium *P. aeruginosa*. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass die anaerobe Fermentation von Pyruvat zu Lactat, Acetat und Succinat die Basis für das Langzeitüberleben dieses Organismus bis zu 17 Tagen bietet. Dabei wird die beteiligte Lactat-Dehydrogenase vom *ldhA*-Gen kodiert, das unabhängig vom Sauerstoffpartialdruck exprimiert wird. Die für die Acetatbildung nötigen Enzyme Phosphotransacetylase und Acetatkinase werden durch das *ackA-pta*-Operon kodiert, welches über den Sauerstoffregulator Anr und das DNA-biegende Protein IHF induziert wird. Zugehörige Bindestellen für diese Regulatoren wurden stromaufwärts des *ackA-pta*-Operons identifiziert.

Schließlich wurde das Anr-abhängige Proteom von *P. aeruginosa* bestimmt. Es enthielt Proteine der Denitrifikation, der Arginin-Fermentation sowie die zugehörigen Enzyme der Biosynthese benötigter Kofaktoren und Transporter. Die erzielten Ergebnisse geben erste detaillierte Einblicke in das Zusammenspiel Anr-abhängiger Prozesse während unterschiedlicher anaerober Adaptationsprozesse.

4.2 Ausblick

Es stellen sich nun folgende Fragen für zukünftige Untersuchungen:

- Welchen Einfluss hat die Pyruvat-Fermentation auf die Bildung und die Persistenz von *P. aeruginosa* Biofilmen? (Experimente zur Biofilmbildung)
- Welches Enzym oder welcher Enzymkomplex ersetzt in *P. aeruginosa* die Funktion der Pyruvat-Formiat-Lyase in *E. coli*? (Enzymaktivität der Pyruvat-Dehydrogenase messen)
- Sind die in den Fermentationsprozessen blockierten *P. aeruginosa*-Mutanten Δpta und $\Delta ldhA$ weniger pathogen als der Wildtyp? (Maus-Infektionsmodell)
- Welche weiteren Gene werden unter Pyruvat-fermentierenden Bedingungen exprimiert? (Genexpressionsstudien)
- Gibt es ausser Anr und IHF noch andere Regulatoren, die einen Einfluss auf die Pyruvat-Fermentation ausüben? (Versuche mit anderen Regulator-Mutanten)
- Welche Rolle spielen Anr-abhängige Genloci für den anaeroben Energiestoffwechsel? (Mutantenstudien mit den neu identifizierten Genloci)
- Wie sieht das gesamte Regulationsnetzwerk beim Überleben von *P. aeruginosa* unter anaeroben Bedingungen aus? (Systembiologischer Ansatz und bioinformatische Modellbildung)

5 Literatur und Internet-Adressen

5.1 Literaturverzeichnis

- Aiba, H., Adhya, S. und de Crombrugghe, B. (1981) Evidence for two gal promoters in intact *Escherichia coli*. J Biol Chem 256:11905-11910.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. und Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. J Mol Biol 215:403-410.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. und Lipman, D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res 25:3389-3402.
- Arai, H., Igarashi, Y. und Kodama, T. (1994) Structure and ANR-dependent transcription of the *nir* genes for denitrification from *Pseudomonas aeruginosa*. Biosci Biotech Biochem 58:1286-1291.
- Arai, H., Igarashi, Y. und Kodama, T. (1995) Expression of *nir* and *nor* genes for denitrification of *Pseudomonas aeruginosa* requires a novel CRP/FNR-related transcriptional regulator, DNR, in addition to ANR. FEBS Lett 371:73-76.
- Arai, H., Kawasaki, S., Igarashi, Y. und Kodama, T. (1996) Arrangement and transcriptional regulation of the denitrification genes in *Pseudomonas aeruginosa*. In: Molecular Biology of Pseudomonads. ASM Press, Washington. Kapitel 26:298-308.
- Arai, H., Kodama, T. und Igarashi, Y. (1997) Cascade regulation of the two CRP/FNR-related transcriptional regulators (ANR and DNR) and the denitrification enzymes in *Pseudomonas aeruginosa*. Mol Microbiol 25:1141-1148.
- Arai, H., Mizutani, M. und Igarashi, Y. (2003) Transcriptional regulation of the *nos* genes for nitrous oxide reductase in *Pseudomonas aeruginosa*. Microbiology 149:29-36.
- Berks, B.C., Ferguson, S.J., Moir, J.W.B. und Richardson, D.J. (1995) Enzymes and associated electron transport systems that catalyse the respiratory reduction of nitrogen oxides and oxyanions. Biochim Biophys Acta 1232:97-173.
- Bertero, M.G., Rothery, R.A., Palak, M., Hou, C., Lim, D., Blasco, F., Weiner, J.H. und Strynadka, N.C. (2003) Insights into the respiratory electron transfer pathway from the structure of nitrate reductase A. Nat Struct Biol 10:681-687.
- Binnerup, S. J. und Sorensen, J. (1993) Long-term oxidant deficiency in *Pseudomonas aeruginosa* PAO303 results in cells which are non-culturable under aerobic conditions. FEMS Microbiol Ecol 13:79-84.

- Birnboim, H.C. und Doly, J. (1979)** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7:1513-1523.
- Böck, A., und Sawers, G. (1996)** Fermentation, p. 262-282. In: F. C. Neidhardt (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella*, cellular and molecular biology, 2nd ed, vol. I. ASM Press, Washington, D.C.
- Braun, C. und Zumft, W.G. (1991)** Marker exchange of the structural genes for nitric oxide reductase blocks the denitrification pathway of *Pseudomonas stutzeri* at nitric oxide. *J Biol Chem* 266:22785-22788.
- Bundy, B.M., Campbell, A.L. und Neidle, E.L. (1998)** Similarities between the *antABC*-encoded anthranilate dioxygenase and the *benABC*-encoded benzoate dioxygenase of *Acinetobacter* sp. strain ADP1. *J Bacteriol* 180:4466-4474.
- Cornish-Bowden, A. (1985)** Nomenclature for incompletely specified bases in nucleic acid sequences: recommendations 1984. *Nucleic Acids Res* 13:3021-3030.
- Cotter, P.A. und Gunsalus, R.P. (1989)** Oxygen, nitrate, and molybdenum regulation of *dmsABC* gene expression in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 171:3817-3823.
- Craig, N.L. und Nash, H.A. (1984)** *E. coli* integration host factor binds to specific sites in DNA. *Cell* 39:707-716.
- Cruz Ramos, H., Hoffmann, T., Marino, M., Nedjari, H., Presecan-Siedel, E., Dreesen, O., Glaser, P. und Jahn, D. (2000)** Fermentative metabolism of *Bacillus subtilis*: physiology and regulation of gene expression. *J Bacteriol* 182:3072-80.
- Darwin, A.J. und Stewart, V. (1995)** Nitrate and nitrite regulation of the Fnr-dependent *aeg-46.5* promoter of *Escherichia coli* K-12 is mediated by competition between homologous response regulators (NarL and NarP) for a common DNA-binding site. *J Mol Biol* 251:15-29.
- Davies, K. J., Lloyd, D. und Boddy, L. (1989)** The effect of oxygen on denitrification in *Paracoccus denitrificans* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J Gen Microbiol* 135:2445-51.
- de Lorenzo, V. und Timmis, K. N. (1994)** Analysis and construction of stable phenotypes in gram-negative bacteria with Tn5- and Tn10-derived minitransposons. *Methods Enzymol* 235:386-405.
- Delic-Attree, I. Toussaint, B. und Vignais, P.M. (1995)** Cloning and sequence analysis of the genes coding for the integration host factor (IHF) and HU proteins of *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene* 154:61-64.

- Delic-Attree, I. Toussaint, B., Froger, A., Willison, J.C. und Vignais, P.M. (1996)** Isolation of an IHF-deficient mutant of a *Pseudomonas aeruginosa* mucoid isolate and evaluation of the role of IHF in *algD* gene expression. *Microbiol* 142:2785-2793.
- Dower, W.J., Miller, J.F. und Ragsdale, C.W. (1988)** High efficiency transformation of *Escherichia coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res* 16:6127-6146.
- Dunn, N. W. und Holloway, B. W. (1971)** Pleiotrophy of p-fluorophenylalanine-resistant and antibiotic hypersensitive mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *Genet Res* 18:185-97.
- Eschbach, M. (1999)** Der anaerobe Energiestoffwechsel von *Pseudomonas aeruginosa*. Diplomarbeit, Universität Freiburg.
- Farinha, M.A. und Kropinski, A.M. (1990)** Construction of broad-host-range plasmid vectors for easy visible selection and analysis of promoters. *J Bacteriol* 172:3496-3499.
- Fernandez-Canon, J.M. und Penalva, M.A. (1998)** Characterization of a fungal maleylacetoacetate isomerase gene and identification of its human homologue. *J Biol Chem* 273:329-337.
- Freestone, P., Nystrom, T., Trinei, M. und Norris, V. (1997)** The universal stress protein, UspA, of *Escherichia coli* is phosphorylated in response to stasis. *J Mol Biol* 274:318-324.
- Friedmann, D.I. (1988)** Integration host factor: a protein for all reasons. *Cell* 55:545-554.
- Galimand, M., Gamper, M., Zimmermann, A. und Haas, D. (1991)** Positive Fnr-like control of anaerobic arginine degradation and nitrate respiration in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 173:1598-1606.
- Gamper, M., Zimmermann, A. und Haas, D. (1991)** Anaerobic regulation of transcription initiation in the *arcDABC* operon of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 173:4742-4750.
- Gennis, R. B. und Stewart, V. (1996).** Respiration, p. 217-261. In: F. C. Neidhardt (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella*, cellular and molecular biology, 2nd ed, vol. I. ASM Press, Washington, D.C.
- Goodrich, J.A., Schwartz, M.L. und McClure, W.R. (1990)** Searching for and predicting the activity of sites for DNA binding proteins: compilation and analysis of the binding sites for *Escherichia coli* integration host factor (IHF). *Nucleic Acids Res* 18:4993-5000.
- Görg, A., Postel, W., Günther, S. und Weser, J. (1985)** Improved horizontal two-dimensional electrophoresis with hybrid isoelectric focusing in immobilized pH gradients in the first dimension and laying-on-transfer to the second dimension. *Electrophoresis* 6:599-604.

- Green, J., Bennett, B., Jordan, P., Ralph, E.T., Thomson, A.J. und Guest, J.R. (1996)** Reconstitution of the [4Fe-4S] cluster in Fnr and demonstration of the aerobic-anaerobic transcription switch *in vitro*. *Biochem J* 316:887-892.
- Haas, D., Gamper, M. und Zimmermann, A. (1992)** Anaerobic control in *Pseudomonas aeruginosa*. In *Pseudomonas, Molecular Biology and Biotechnology*. Galli, E., Silver, S. und Withold, B. (ed.). Washington, DC: American Society for Microbiology, pp. 177-187.
- Hanahan, D. (1983)** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166:557-580.
- Hancock, R.E. und Nikaido, H. (1978)** Outer membranes of gram-negative bacteria. XIX. Isolation from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and use in reconstitution and definition of the permeability barrier. *J Bacteriol* 136:381-390.
- Hanna, S.L., Sherman, N.E., Kinter, M.T. und Goldberg, J.B. (2000)** Comparison of proteins expressed by *Pseudomonas aeruginosa* strains representing initial and chronic isolates from a cystic fibrosis patient: an analysis by 2-D gel electrophoresis and capillary column liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Microbiology* 146:2495-2508.
- Hassett, D. J., Cuppoletti, J., Trapnell, S., Lyman, S.V., Rowe, J. J., Sun Yoon, S., Hilliard, G. M., Parvatiyar, K., Kamani, M. C., Wozniak, D. J., Hwang, S. H., McDermott, T. R. und Ochsner, U. A. (2002)** Anaerobic metabolism and quorum sensing by *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in chronically infected cystic fibrosis airways: rethinking antibiotic treatment strategies and drug targets. *Adv Drug Deliv Rev* 54:1425-1443.
- Hiller, K. (2003)** Modulierung virtueller zweidimensionaler Proteingele und Untersuchung des Anr-Regulons von *Pseudomonas aeruginosa* mittels Proteomics. Diplomarbeit, Technische Universität Braunschweig.
- Hoang, T.T., Karkhoff-Schweizer, R.R., Kutchma, A.J. und Schweizer, H. P. (1998)** A broad-host-range Flp-FRT recombination system for site-specific excision of chromosomally-located DNA sequences: application for isolation of unmarked *Pseudomonas aeruginosa* mutants. *Gene* 212:77-86.
- Hussain, H., Grove, J., Griffiths, L., Busby, S. und Cole, J. (1994)** A seven-gene operon essential for formate-dependent nitrite reduction to ammonia by enteric bacteria. *Mol Microbiol* 12:153-163.
- Jeyaseelan, K., Guest, J.R. und Visser, J. (1980)** The pyruvate dehydrogenase complex of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1: Purification, properties and characterization of mutants. *J Gen Microbiol* 120:393-402.

- Kaiser, M. und Sawers, G. (1995)** Nitrate repression of the *Escherichia coli pfl* operon is mediated by the dual sensors NarQ and NarX and the dual regulators NarL and NarP. J Bacteriol 177:3647-3655.
- Kalman, L. und Gunsalus, R.P. (1988)** The *frdR* gene of *Escherichia coli* globally regulates several operons involved in anaerobic growth in response to nitrate. J Bacteriol 170:623-629.
- Kalman, L. und Gunsalus, R.P. (1989)** Identification of a second gene involved in global regulation of fumarate reductase and other nitrate-controlled genes for anaerobic respiration in *Escherichia coli*. J Bacteriol 171:3810-3816.
- Kawasaki, S., Arai, H., Kodama, T. und Igarashi, Y. (1997)** Gene cluster for dissimilatory nitrite reductase (*nir*) from *Pseudomonas aeruginosa*: Sequencing and identification of a locus for heme *d*₁ biosynthesis. J Bacteriol 179:235-242.
- Kerber, N. L. und Cardenas, J. (1982)** Nitrate reductase from *Rhodopseudomonas sphaeroides*. J Bacteriol 150:1091-1097.
- Khoroshilova, N., Beinert, H. und Kiley, P. (1995)** Association of a polynuclear iron-sulfur center with a mutant Fnr protein enhances DNA binding. Proc Natl Acad Sci USA 92:2499-2503.
- Krieger, R. (2001)** Transkriptionelle Kontrolle der Denitrifikation in *Pseudomonas aeruginosa*. Dissertation, Universität Freiburg.
- Krieger, R., Rompf, A., Schobert, M. und Jahn, D. (2002)** The *Pseudomonas aeruginosa hemA* promoter is regulated by Anr, Dnr, NarL and Integration Host Factor. Mol Genet Genomics 267:409-17.
- Kur, J., Hasan, N. und Szybalski, W. (1989)** Physical and biological consequences of interactions between integration host factor (IHF) and coliphage lambda late p' R promoter and its mutants. Gene 81:1-15.
- Laemmli, U.K. (1970)** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. Nature 227:680-685.
- Lahti, R., Pitkaranta, T., Valve, E., Ilta, I., Kukko-Kalske, E., Heinonen, J. (1988)** Cloning and characterization of the gene encoding inorganic pyrophosphatase of *Escherichia coli* K-12. J Bacteriol 170:5901-5907.
- Lazazzera, B.A., Beinert, H., Khoroshilova, N., Kennedy, M.C. und Kiley, P.J. (1996)** DNA binding and dimerization of the Fe-S-containing FNR proteien from *Escherichia coli* are regulated by oxygen. J Biol Chem. 271:2762-2768.

- Lessie, T.G. und Phibbs, P.V. Jr. (1984)** Alternative pathways of carbohydrate utilization in pseudomonads. *Annu Rev Microbiol* 38:359-388.
- Lu, C.-D., Winteler, H., Abdelal, A. und Haas, D. (1999)** The ArgR regulatory protein, a helper to the anaerobic regulator Anr during transcriptional activation of the *arcD* promoter in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 181: 2459-2464.
- Ma, J.-F., Ochsner, U., Klotz, M.G., Nanayakkara, V.K., Howell, M.L., Johnson, Z., Posey, J.E., Vasil, M.L., Monaco, J.J. und Hassett, D.J. (1999)** Bacterioferritin A modulates catalase A (KatA) activity and resistance to hydrogen peroxide in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 181:3730-3742.
- MacGregor, C.H., Wolf, J.A., Arora, S.K. und Phibbs, Jr., P.V. (1991)** Cloning of a catabolite repression control (*crc*) gene from *Peudomonas aeruginosa*, expression of the gene in *Escherichia coli*, and identification of the gene product in *Peudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 173:7204-7212.
- MacGregor, C.H., Wolff, J.A., Arora, S.K., Hylemon, P.B. und Phibbs, P.V. (1992)** Catabolite repression control in *Pseudomonas aeruginosa*. In: *Pseudomonas: molecular biology and biotechnology*. American Society for Microbiology, Washington.
- Matin, A. und Konings, W.N. (1973)** Transport of lactate and succinate by membrane vesicles of *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* and a *pseudomonas* species. *Eur J Biochem* 34:58-67.
- Mercenier, A., Simon, J. P., Vander Wauven, C., Haas, D. und Stalon, V. (1980)** Regulation of enzyme synthesis in the arginine deiminase pathway of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 144:159-63.
- Miller, J.H. (1992)** A short course in bacterial genetics. A laboratory manual and handbook for *Escherichia coli* and related bacteria. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York.
- Moreno-Vivian, C. und Ferguson, S.J. (1998)** Definition and distinction between assimilatory, dissimilatory and respiratory pathways. *Mol Microbiol* 29:664-666.
- Moreno-Vivian, C., Cabello, P., Martinez-Luque, M., Blasco, R. und Castillo, F. (1999)** Prokaryotic nitrate reduction: molecular properties and functional distinction among bacterial nitrate reductases. *J Bacteriol* 181:6573-6584.
- Münch, R., Hiller, K., Barg, H., Heldt, D., Linz, S., Wingender, E. und Jahn, D. (2003)** PRODORIC: prokaryotic database of gene regulation. *Nucleic Acids Res* 31:266-9.

- Nakano, M.M., Dailly, Y.P., Zuber, P. und Clark, D.P. (1997)** Characterization of anaerobic fermentative growth of *Bacillus subtilis*: identification of fermentation end products and genes required for growth. *J Bacteriol* 179:6749-55.
- Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D. und Ehrhardt, W. (1988)** Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* 9:255-262.
- Nishijyo, T., Park, S.M., Lu, C.D., Itoh, Y. und Abdelal, A.T. (1998)** Molecular characterization and regulation of an operon encoding a system for transport of arginine and ornithine and the ArgR regulatory protein in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 180:5559-66.
- Nystrom, T. (2003)** Nonculturable bacteria: programmed survival forms or cells at death's door? *Bioessays* 25:204-11.
- Nystrom, T. und Neidhardt, F. C. (1994)** Expression of the universal stress protein, UspA, of *Escherichia coli* during growth arrest. *Mol Microbiol* 11(3):537-544.
- O'Farrell, P. H. (1975)** High resolution two-dimensional electrophoresis. *J Biol Chem* 250:4007-4021.
- O'Toole, G.A., Gibbs, K.A., Hager, P.W., Phibbs, Jr., P.V. und Kolter, R. (1999)** The global carbon metabolism regulator Crc is a component of a signal transduction pathway required for biofilm development in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 182:425-431.
- Oppenheim, A.B., Rudd, K.E., Mendelson, I. und Teff, D. (1993)** Integration host factor binds to a unique class of complex repetitive extragenic DNA sequences in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 10:113-122.
- Ornston, L. N. und Stanier, R. Y. (1966)** The conversion of catechol and protocatechuate to β -keto adipate by *Pseudomonas putida*. *J Biol Chem* 241:3776-3786.
- Palleroni, N.J. (1992)** Introduction to the family *Pseudomonadaceae*. In: *Prokaryotes* (Second Edition) 160:3071-3085.
- Parales, R.E. und Harwood, C.S. (1993)** Regulation of the *pcaIJ* genes for aromatic acid degradation in *Pseudomonas putida*. *J Bacteriol* 175:5829-5838.
- Rabilloud, T., Strub, J.M., Luche, S., Girardet, J.L., van Dorsselaer, A. und Lundardi, J. (2000)** Ruthenium II tris (bathophenanthroline disulfonate), a powerful fluorescent stain for detection of proteins in gel with minimal interference in subsequent mass spectrometry analysis. *Proteome*.
(online-Artikel. <http://link.springer.de/link/service/journals/10216/contents/00/00002/>)

- Rabilloud, T., Strub, J.M., Luche, S., van Dorsselaer, A., und Lunardi, J. (2001)** A comparison between Sypro Ruby and ruthenium II tris (bathophenanthroline disulfonate) as fluorescent stains for protein detection in gels. *Proteomics* 1:699-704.
- Rae, J.L., Cutfield, J.F. und Lamont, I.L. (1997)** Sequences and expression of pyruvate dehydrogenase genes from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 179:3561-71.
- Richardson, D.J. und Watmough, N.J. (1999)** Inorganic nitrogen metabolism in bacteria. *Curr Opin Chem Biol* 3:207-219.
- Richardson, D.J., King, G.F., Kelly, D.K., McEwan, A.G., Ferguson, S.J. und Jackson, J.B. (1988)** The role of auxiliary oxidants in maintaining redox balance during phototrophic growth of *Rhodobacter capsulatus* on propionate or butyrate. *Arch Microbiol* 150:131-137.
- Rompf, A., Hungerer, C., Hoffmann, T., Lindenmeyer, M., Römling, U., Gross, U., Doss, M.O., Arai, H., Igarashi, Y. und Jahn, D. (1998)** Regulation of *Pseudomonas aeruginosa* *hemF* and *hemN* by the dual action of the redox response regulators Anr and Dnr. *Mol Microbiol* 29:985-97.
- Sabra, W., Kim, E.J. und Zeng, A.P. (2002)** Physiological responses of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 to oxidative stress in controlled microaerobic and aerobic cultures. *Microbiology* 148:3195-202.
- Salmond, C.V., Knoll, R.G. und Booth, I.R. (1984)** The effect of food preservatives on pH homeostatis in *Escherichia coli*. *J Gen Microbiol* 130:2845-2850.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T. (1989)** Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sawers, R.G. (1991)** Identification and molecular characterization of a transcriptional regulator from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 exhibiting structural and functional similarity to the FNR protein of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 5:1469-1481.
- Schreiber, K. (2003)** Der fermentative Stoffwechsel von *Pseudomonas aeruginosa*. Diplomarbeit, Technische Universität Braunschweig.
- Siddiqui, R.A., Warnecke-Eberz, U., Hengsberger, A., Schneider, B., Kostka, S. und Friedrich, B. (1993)** Structure and function of a periplasmatic nitrate reductase in *Alcaligenes eutrophus* H16. *J Bacteriol* 175:5867-5876.
- Spiro, S. und Guest, G.R. (1990)** FNR and its role in oxygen regulated gene expression in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Rev* 75:399-428.

- Stancik, L.M., Stancik, D.M., Schmidt, B., Barnhart, D.M., Yoncheva, Y.N. und Slonczewski, J.L. (2002)** pH-Dependent Expression of Periplasmic Proteins and Amino Acid Catabolism in *Escherichia coli*. J Bacteriol 184:4246-4258.
- Stewart, V. (1993)** Nitrate regulation of anaerobic respiratory gene expression in *Escherichia coli*. Mol Microbiol 9:425-434.
- Stover, C.K., Pham, X.Q., Erwin, A.L., Mizoguchi, S.D., Warrenner, P., Hickey, M.J., Brinkman, F.S., Hufnagle, W.O., Kowalik, D.J., Lagrou, M., Garber, R.L., Goltry, L., Tolentino, E., Westbrook-Wadman, S., Yuan, Y., Brody, L.L., Coulter, S.N., Folger, K.R., Kas, A., Larbig, K., Lim, R., Smith, K., Spencer, D., Wong, G.K., Wu, Z., Paulsen, I.T., Reizer, J., Saier, M.H., Hancock, R.E., Lory, S. und Olson, M.V. (2000)** Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. Nature 406:959-64.
- Thompson, D.K. und Chen, J.S. (1990)** Purification and properties of an acetoacetyl coenzyme A-reacting phosphotransbutyrylase from *Clostridium beijerinckii* ("*Clostridium butylicum*") NRRL B593. Appl Environ Microbiol 56:607-613.
- Tyson, K.L., Bell, A.I., Cole, J.A. und Busby, S.J.W. (1993)** Definition of nitrite and nitrate response elements at the anaerobically inducible *Escherichia coli nirB* promoter: interactions between FNR and NarL. Mol Microbiol 7:151-157.
- Vander Wauven, C, Pierard, A., Kley-Raymann, M. und Haas, D. (1984)** *Pseudomonas aeruginosa* mutants affected in anaerobic growth on arginine: evidence for a four-gene cluster encoding the arginine deiminase pathway. J Bacteriol 160:928-934.
- Winteler, H.V. und Haas, D. (1996)** The homologous regulators Anr of *Pseudomonas aeruginosa* and Fnr of *Escherichia coli* have overlapping but distinct specificities for anaerobically inducible promoters. Microbiology 142:685-693.
- Winteler, H.V., Schneidinger, B., Jaeger, K.E. und Haas, D. (1996)** Anaerobically controlled expression system derived from the *arcDABC* operon of *Pseudomonas aeruginosa*: application to lipase production. Appl Environ Microbiol 62:3391-3398.
- Wolff, J.A., MacGregor, C.H., Eisenberg, R.C. und Phibbs, P.V. Jr (1991)** Isolation and characterization of catabolite repression control mutants of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. J Bacteriol 173:4700-4706.
- Worlitzsch, D., Tarran, R., Ulrich, M., Schwab, U., Cekici, A., Meyer, K.C., Birrer, P., Bellon, G., Berger, J., Weiss, T., Botzenhart, K., Yankaskas, J.R., Randell, S., Boucher, R.C. und Döring, G. (2002)** Effects of reduced mucus oxygen concentration in airway *Pseudomonas* infections of cystic fibrosis patients. J Clin Invest 109:317-25.

- Wozniak, D.J. (1994)** Integration host factor and sequences downstream of the *Pseudomonas aeruginosa algD* transcription start site are required for expression. J Bacteriol 176:5068-5076.
- Wozniak, D.J. und Ohman, D.E. (1993)** Involvement of the alginate *algT* gene and integration host factor in the regulation of the *Pseudomonas aeruginosa algB* gene. J Bacteriol 175:4145-4153.
- Xu, B., Jahic, M., Blomsten, G. und Enfors, S.O. (1999)** Glucose overflow metabolism and mixed-acid fermentation in aerobic large-scale fed-batch processes with *Escherichia coli*. Appl Microbiol Biotechnol 51:564-71.
- Ye, R.W., Haas, D., Ka, J.-O., Krishnapillai, V., Zimmermann, A., Baird, C. und Tiedje, J.M. (1995)** Anaerobic activation of the entire denitrification pathway in *Pseudomonas aeruginosa* requires Anr, an analog of Fnr. J Bacteriol 177:3606-3609.
- Zimmermann, A., Reimmann, C., Galimand, M. und Haas, D. (1991)** Anaerobic growth and cyanide synthesis of *Pseudomonas aeruginosa* depend on *anr*, a regulatory gene homologous with *fnr* of *Escherichia coli*. Mol Microbiol 5:1483-1490.

5.2 Internet-Adressen

BLAST-Server:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>

(National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine,
National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)

PubMed-Server:

[http:// www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed)

(National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine,
National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)

PRODORIC-Datenbank:

<http://prodoric.tu-bs.de>

(Technische Universität Braunschweig, Arbeitskreis Prof. Dr. D. Jahn)

Colibri:

<http://bioweb.pasteur.fr/GenoList/Colibri>

(Institut Pasteur, Paris, Frankreich)

Expasy:

<http://www.expasy.org>

(Swiss Institute of Bioinformatics, Geneva, Swiss)

Pseudomonas-Genomprojekt:

<http://www.pseudomonas.com>

(*Pseudomonas Genome Project*, University of British Columbia, Vancouver, B.C.,
Canada)

Danksagung

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. Dieter Jahn für das interessante Thema und die hervorragende und motivierende Betreuung während der gesamten Doktorarbeit ganz herzlich bedanken.

Für die freundliche Übernahme des Koreferats danke ich Herrn Prof. Dr. K. N. Timmis, sowie Herrn Prof. Dr. S. Dübel für die freundliche Teilnahme an der Prüfungskommission.

Bedanken möchte ich mich auch bei Dr. Lothar Jänsch und Matthias Trost für die MS-Identifizierung von vielen Proteinen.

Der „*Pseudomonas*-Gruppe“ danke ich herzlich für die gute Zusammenarbeit und zahlreiche Diskussionen. Mein besonderer Dank für die schöne Zeit gilt Dr. Max Schobert, Nicole Quäck, Katharina Trunk, Kerstin Schreiber, Dana Heldt, Mike Hasenberg, Dr. Elisabeth Härtig, Susanne Kneip, Anja Hartmann und Dr. Robert Krieger sowie meinen Mitarbeiterinnen Nelli Bös und Barbara Goretzki.

Für die große Hilfe bei allen Computer-spezifischen Problemen danke ich Karsten Hiller, Maurice Scheer, Andreas Grothe und Richard Münch.

Bei allen bisher nicht genannten Kolleginnen und Kollegen der gesamten Arbeitsgruppe Jahn bedanke ich mich für die angenehme und kameradschaftliche Arbeitsatmosphäre.